

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de E. Metchnikoff.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MICROBES ANTAGONISTES DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

(*BACILLUS ANTHRACIS*)

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

par W. SILBERSCHMIDT et E. SCHOCH

(Travail de l'Institut d'hygiène de l'Université de Zurich.)

Le point de départ des expériences que nous allons relater dans ce travail est l'observation suivante :

Un médecin nous envoie une pustule dont il venait de faire l'excision dans un cas suspect de charbon. Le malade était occupé dans une filature de crins ; ces crins provenaient en majeure partie de Russie et de l'Amérique du Sud. Nous savons que dans ces deux pays la maladie charbonneuse s'observe assez souvent chez le cheval.

Une émulsion de la pustule est inoculée à une souris et à un cobaye. La souris meurt en moins de quarante-huit heures ; à l'autopsie pas d'œdème typique et pas de bacille du charbon ; nous trouvons dans les frottis d'organes et dans la culture le bacille de Friedländer à l'état de pureté. Le cobaye inoculé avec la même émulsion meurt un peu plus tard ; le diagnostic de

charbon est facile; la bactériémie se trouve dans les frottis et dans la culture de la rate.

L'examen microscopique direct de la pustule nous avait déjà permis de confirmer le diagnostic de charbon. La culture sur gélose du contenu de cette pustule nous fournit entre autres des colonies de bacille du charbon et du bacille de Friedländer.

Cette observation est intéressante à plus d'un chef. La présence du bacille de Friedländer dans une pustule maligne n'est pas fréquente et mérite d'être notée. Le fait que ce bacille est capable d'arrêter le développement du *Bacillus anthracis in vivo* aurait pu avoir pour conséquence une erreur de diagnostic. Si nous nous étions contentés d'une inoculation à la souris, nous aurions été conduits à nier la présence du bacille du charbon. Rappelons, à cette occasion, que toute analyse bactériologique de matières suspectes doit comporter l'examen microscopique direct, que nous plaçons en première ligne; la culture et l'inoculation à l'animal complètent ce premier examen.

C'est en partant de l'observation que nous venons de résumer, que nous avons entrepris une série d'expériences dans le but d'étudier le rôle de l'infection mixte sur le développement de la bactériémie charbonneuse.

Nous ne referons pas ici l'historique de la question de l'infection mixte. Qu'il nous suffise de rappeler les travaux d'Emmerich, de Pavlovsky, de Bouchard, Fortineau, etc., sur le pouvoir antagoniste du streptocoque, du *Bacillus prodigiosus*, du bacille de Friedländer et surtout du pyocyanique sur l'infection charbonneuse. La pyocyanase, extrait stérilisé de cultures de bacille pyocyanique, a été préconisée par Emmerich et Loeb comme moyen prophylactique et thérapeutique contre une série de maladies bactériennes. Les auteurs se sont basés sur l'action « antiseptique », dissolvante de cultures de pyocyanique stérilisées sur un grand nombre de microbes, *Bacillus anthracis* entre autres.

L'infection mixte est un des problèmes que Metchnikoff a abordés en lui donnant une impulsion nouvelle. Lors du séjour de l'un de nous à l'Institut Pasteur, von Dungern a repris, sous la direction de notre vénéré Maître, l'étude expérimentale de l'antagonisme du bacille de Friedländer vis-à-vis de la bactériémie charbonneuse. Les expériences d'infection

mixte dans la chambre antérieure de l'œil du lapin ont fourni un résultat très concluant : l'injection simultanée de cultures vivantes de *Bacillus anthracis* et de bacille de Friedländer était tolérée, tandis que les lapins témoins, qui n'avaient reçu que la bactériémie, mouraient de charbon. Les expériences effectuées avec des cultures de Friedländer stérilisées ne donnèrent pas de résultats aussi constants, l'injection sous-cutanée non plus.

Jusqu'ici on s'est surtout occupé de l'infection mixte en tant que facteur aggravant la marche de la maladie primaire. On n'a pas assez tenu compte, à notre avis, de l'action empêchante, de l'antagonisme proprement dit. Dans ses recherches sur le choléra expérimental Metchnikoff a reconnu que les divers microbes de l'estomac ne sont pas indifférents quant au développement de l'infection cholérique. Tandis qu'une levure (*Torula*), une sarcine et un bacille coliforme favorisaient le développement de l'infection intestinale chez le lapin, le bacille pyocyanique, un coccus blanc et un autre microcoque exerçaient une action nettement empêchante. La lutte contre l'infection intestinale au moyen d'ingestion de cultures bactériennes (Joghourt, bac. bulgare, etc.) est une application pratique de ces expériences.

Les recherches que nous avons entreprises ont pour but d'apporter une contribution au problème complexe qui nous occupe.

RÉSUMÉ DES EXPÉRIENCES

Nous avons recherché l'action antagoniste d'un certain nombre de microbes, le bacille de Friedländer, les bacilles typhique, paratyphique, coli, pyocyanique, etc. sur le développement de l'infection charbonneuse.

Nous avons commencé par une série d'expériences *in vitro*, qui nous ont permis de constater que le bacille du charbon pousse sur milieux de culture solides à côté de la plupart de ses antagonistes, contrairement à ce qu'on observe avec le pyocyanique.

C'est le cobaye qui a servi à la plus grande partie de nos expériences; nous avons également fait des inoculations au lapin et à la souris. En vue d'obtenir des résultats concluants, nous avons opéré avec de fortes doses d'une culture très viru-

lente de *Bacillus anthracis*. Le cobaye témoin mourait généralement dans les quarante-huit heures après l'injection.

La plupart des animaux ont été infectés par injection sous-cutanée d'une émulsion en bouillon ou en solution physiologique de culture fraîche sur gélose.

Le plus souvent nous injectons le bacille du charbon et, immédiatement après, l'émulsion de la culture dont nous voulions examiner les propriétés antagonistes; d'autres fois nous faisons le mélange *in vitro*. Nous avons fait l'autopsie et examiné le sang et la rate des animaux morts au cours de ces expériences.

Bacille de Friedländer et *Bacillus anthracis*.

a) EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE. — Sur 11 cobayes inoculés simultanément au même point avec les deux cultures, 8 ont survécu, 3 sont morts 1 jour 1/2, 2 et 19 jours après l'inoculation. A l'autopsie on ne retrouve que le bacille de Friedländer. Les témoins ayant reçu la culture de charbon seule ont succombé en 3 et 4 jours.

3 cobayes ont reçu les inoculations en 2 points différents, l'une à droite, l'autre sur le côté gauche; résultat : 2 animaux ont survécu, 1 est mort en 3 jours. Les cobayes morts après l'inoculation sous-cutanée des deux cultures n'ont présenté à l'autopsie que du Friedländer. Une injection intraveineuse des deux microbes tue le cobaye en 1 jour 1/2, comme le témoin.

Un cobaye qui avait reçu une injection sous-cutanée de culture de Friedländer est inoculé, 8 jours plus tard, au même point, avec le bacille du charbon; il meurt au bout de 4 jours, le témoin 2 jours plus tôt. A l'autopsie nous ne retrouvons que le *Bacillus anthracis*.

L'action antagoniste du bacille de Friedländer est donc très nette chez le cobaye. Elle se manifeste surtout lorsque les deux cultures sont injectées en un même point. Cette action n'est pas durable : une injection faite au même point 8 jours après l'injection du Friedländer n'est pas tolérée : le cobaye meurt de charbon avec un retard de 2 jours sur le témoin.

b) EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS. — Sur 8 animaux, aucun n'a survécu. Les 4 souris inoculées sous la peau au même endroit, de même que les 2 souris inoculées en des points différents, sont mortes, à une exception près, en même temps que les témoins. 2 autres animaux infectés au moyen de quelques lésions cutanées superficielles faites au bistouri, sont morts 4 et 21 jours après l'infection, alors que les témoins ont survécu 2 jours 1/2 et 7 jours 1/2. L'infection superficielle n'étant pas dosable, nous n'attacherons pas une trop grande importance à ce résultat. Le fait que toutes les souris sont mortes provient de leur plus grande sensibilité au bacille de Friedländer. Tandis que sur 8 cobayes témoins 7 résistent à l'injection du bacille de Friedländer, les 4 souris témoins meurent à la suite de l'injection d'une faible dose de culture pure de Friedländer. Point important, l'examen du sang a donné du bacille de Friedländer à l'état de pureté dans 6 cas sur 8; les 2 autres souris ont fourni une culture mixte (Friedländer et charbon). Les

souris inoculées simultanément avec la bactériidie charbonneuse et le bacille de Friedländer meurent; dans la plupart des cas nous ne trouvons que le Friedländer à l'autopsie, le *Bacillus anthracis* ayant disparu.

c) EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN. — Contrairement à ce que nous avons observé chez le cobaye, les 5 lapins inoculés, soit sous la peau, soit dans les veines, n'ont pas résisté; les injections simultanées de Friedländer et de charbon ont tué les lapins aussi vite que la culture de charbon seul. Les 2 animaux témoins, qui n'ont reçu que le Friedländer, ont survécu.

Les expériences sur le lapin sont intéressantes; elles nous montrent que l'antagonisme entre le Friedländer et le *Bacillus anthracis* ne se manifeste pas chez le lapin comme chez le cobaye ou chez la souris. Ce fait est confirmé par les résultats de l'autopsie: l'examen du sang ou de la rate des lapins inoculés avec les deux microbes nous a fourni des cultures de charbon, alors que pour le cobaye et pour la souris nous n'avons généralement obtenu que du Friedländer.

Bacille typhique (d'Ebert) et charbon.

a) EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE. — Sur 12 animaux inoculés sous la peau simultanément, 5 ont survécu et 7 sont morts; dans 4 cas la survie a été de 3, 3 1/2, 6 1/2 et 13 jours sur le témoin charbon seul, pour les 3 autres animaux les différences sont moins nettes. A l'autopsie nous n'avons obtenu une culture mixte de bacille typhique et de charbon que dans un cas, tandis que dans les autres la bactériidie charbonneuse avait disparu. L'inoculation du bacille typhique 8 heures après la culture du *Bacillus anthracis* n'a pas retardé la mort du cobaye; à l'autopsie nous avons obtenu une culture mixte, donc présence des deux microbes dans divers organes. Dans un cas nous avons injecté le mélange des deux cultures dans la veine jugulaire, chez un autre cobaye dans le péritoine: les 2 animaux sont morts en 48 heures; les cultures n'ont donné que du bacille typhique.

b) EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS. — 7 souris ont reçu deux cultures en injection sous-cutanée simultanément et au même point; 5 animaux ont survécu et 2 sont morts avec le bacille typhique. 4 autres souris ont été inoculées en des points différents, l'une des cultures étant injectée sous la peau du dos, l'autre sous la peau du ventre; 3 animaux ont succombé avec un retard marqué sur le témoin, le 4^e a survécu.

L'infection superficielle au moyen de quelques lésions cutanées au bistouri n'a pas donné de résultat concluant: bien que nous ayons frotté une assez forte dose de culture d'anthrax sur la peau lésée, la souris témoin et une des souris à infection mixte ont résisté, la 2^e est morte de charbon.

c) EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN. — Une injection sous-cutanée des deux cultures est tolérée alors que le témoin-charbon seul meurt en 1 jour 1/2; 4 lapins inoculés dans la veine de l'oreille avec un mélange de deux cultures meurent; dans deux cas l'examen microscopique et la culture du sang ne fournissent pas de charbon. Dans un autre cas l'inoculation de la bactériidie sous la peau et du bacille typhique dans la veine tue le lapin en 4 jours avec un résultat négatif à l'autopsie.

Les expériences relatées ici prouvent que le bacille typhique est nettement antagoniste et que, pour le cobaye comme pour la souris, l'injection sous-

cutanée simultanée du bacille typhique et de la bactériémie charbonneuse permet d'empêcher le développement de l'infection charbonneuse. Pour le lapin les résultats sont moins concluants.

Bacille paratyphique B et charbon.

4 EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE, 2 SUR LA SOURIS, ET 2 SUR LE LAPIN. — Aucun animal n'a survécu; quelques-uns ont présenté une survie de 2 à 4 jours sur le témoin; à l'autopsie nous avons généralement trouvé le bacille du charbon soit seul, soit avec le paratyphique. Nous pouvons conclure de ces quelques résultats que, contrairement à ce que nous avons observé pour le bacille d'Eberth, l'action antagoniste *in vivo* de la culture de bacille paratyphique B que nous avons inoculé n'était pas notable.

Bacterium coli et charbon.

a) EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE. — Sur 4 injections sous-cutanées au même point 2 survies et 2 décès; les 2 cobayes inoculés en 2 points différents meurent quelques heures après les témoins, de même que l'animal qui reçoit le *Bacterium coli* 8 heures après l'injection de charbon. Une injection intraveineuse et une injection intrapéritonéale du mélange tuent les cobayes en 2 jours et 2 jours 1/2. Dans le tissu sous-cutané et dans les organes nous trouvons presque régulièrement le *Bacillus anthracis* avec le *B. coli*; dans un cas où deux le *B. coli* est resté localisé au point d'inoculation, tandis que dans la rate il n'y avait que du charbon.

b) EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS. — 4 injections sous-cutanées au même point, avec une survie; une injection en 2 points séparés, avec mort en même temps que le témoin; à l'autopsie *Bacillus anthracis*. Dans un cas d'injection de culture mixte dans le péritoine, la souris meurt en 24 heures; à l'autopsie on ne trouve que du *B. coli*.

c) EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN. — Un animal inoculé sous la peau survit, le témoin charbon seul meurt en 2 jours; 2 autres lapins sont injectés par la voie veineuse: l'un survit, l'autre meurt de *B. coli*; un 4^e lapin reçoit le charbon en injection sous-cutanée et le *Bacterium coli* dans la veine: mort de charbon en 3 jours, soit 24 heures après le témoin charbon seul.

De même que pour le Friedländer et pour le bacille typhique, nous avons pu démontrer l'action nettement antagoniste du *Bacterium coli* vis-à-vis de la bactériémie charbonneuse *in vivo*.

Bacille pyocyanique et charbon.

L'antagonisme de ces deux microbes ayant déjà été confirmé par de nombreux travaux, nous nous sommes contentés d'un petit nombre d'expériences pouvant servir de terme de comparaison.

a) EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE. — Sur 4 cobayes injectés avec les 2 cultures sous la peau, 2 ont survécu, les 2 autres meurent 3 jours après les témoins. A l'autopsie pas de charbon, pyocyanique dans tous les organes.

Comme pour les autres bactéries examinées, l'action antagoniste est moins nette lorsque l'inoculation est faite en des points différents. Un cobaye ayant reçu le pyocyanique sous la peau et le charbon dans le péritoine meurt de charbon en même temps que le témoin (charbon seul).

b) EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS. — Sur 3 souris injectées sous la peau au même point, 2 résistent, la 3^e meurt de charbon. 2 souris ayant reçu une injection simultanée dans le péritoine et 4 animaux injectés en des points différents (péritoine et tissu sous-cutané) meurent. L'effet antagoniste n'est pas net, l'injection intrapéritonéale tuant trop vite.

c) EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN. — 2 injections des deux cultures dans la veine : les lapins survivent alors que les témoins (charbon seul) meurent en 1 1/2 et en 4 jours. Un lapin injecté sous la peau meurt de pseudo-tuberculose le 10^e jour : pas de charbon. Une 4^e expérience avec injection de pyocyanique dans les veines et de charbon sous la peau tue l'animal ; les 2 microbes se retrouvent à l'autopsie.

Ces quelques expériences confirment les données déjà acquises, à savoir que le bacille pyocyanique est un antagoniste du *Bacillus anthracis in vivo*. Elles nous montrent que l'action antagoniste de ce bacille n'est pas supérieure à celle de quelques autres micro-organismes que nous avons examinés.

Nous avons encore inoculé le bacille du charbon avec le pneumocoque, le streptocoque, le prodigiosus, le *Proteus vulgaris*, le *Bacillus mesentericus*. Nous n'avons pas obtenu de résultats aussi nets que dans les expériences relatées dans ce travail. Le petit nombre de ces expériences ne nous permet pas de conclusions définitives.

EXPÉRIENCES AVEC DES CULTURES DE FRIEDLÄNDER STÉRILISÉES. — Ces expériences ont été absolument négatives. Le bacille de Friedländer que nous avions tué par chauffage au bain-marie, injecté avec une culture virulente de *Bacillus anthracis* n'a pas empêché l'infection charbonneuse.

EXPÉRIENCES D'INOCULATION SUCCESSIVE DU CHARBON ET DE L'ANTAGONISTE. — En règle générale, l'action antagoniste ne se manifeste nettement que lorsque les deux microbes sont inoculés simultanément au même endroit ; elle est déjà moins sûre avec des injections en des points différents. Il était intéressant de rechercher si l'injection successive au même point avait une action marquée sur la marche de l'infection charbonneuse.

Des cobayes, inoculés avec une culture de charbon, reçoivent, 8 heures après cette première inoculation, des cultures de Friedländer, de bacille typhique ou de *Bacterium coli* : dans aucun cas nous n'avons observé une survie. Les animaux moururent en présentant une infection mixte, le bacille du charbon se retrouvant en abondance dans les organes. Un cobaye ayant un gros abcès à la suite de l'injection d'une culture de bacille typhique reçoit une culture de charbon dans l'abcès : il meurt de charbon.

Ces quelques expériences nous prouvent que l'action antagoniste des microbes étudiés est très limitée.

Les animaux ayant résisté à l'inoculation de cultures mixtes sont-ils immunisés contre l'infection charbonneuse ? Nos expériences nous obligent à répondre par la négative. Nous avons injecté le charbon à plusieurs animaux ayant résisté à l'injection de cultures mélangées et nous n'avons pas observé de survie. D'après nos expériences, la survie après l'inoculation simultanée de bacille du charbon et d'un antagoniste ne confère pas l'immunité contre une infection charbonneuse ultérieure.

Dans les expériences que nous venons de résumer, nous avons pu démontrer que, en dehors du bacille pyocyanique et du bacille de Friedländer, d'autres microbes, le bacille d'Eberth et le *Bacterium coli* entre autres, exercent une action nettement antagoniste vis-à-vis de l'infection charbonneuse. Cette action antagoniste s'exerce, bien que les microbes en question ne soient pas antagonistes dans les cultures *in vitro*. Elle est surtout manifeste lorsque l'inoculation du charbon et de l'antagoniste a lieu au même point et simultanément. Les inoculations en des points différents ne fournissent pas un résultat aussi constant, bien que la survie ait pu être observée souvent.

Les trois espèces d'animaux ayant servi à nos expériences : cobaye, souris et lapin, ne se sont pas toujours comportés de la même façon. Tandis que le cobaye nous a fourni le plus grand nombre de survies, les expériences sur le lapin ont fourni des résultats moins concluants. La souris, très sensible à l'injection du Friedländer, a mieux résisté à l'infection mixte avec le bacille typhique.

L'antagonisme que nous avons étudié ne se manifeste que lorsque l'infection est simultanée ; une injection de l'antagoniste huit heures après l'infection charbonneuse ne préserve plus l'animal.

Les cultures de Friedländer tuées par la chaleur n'exercent plus leur action antagoniste.

Les animaux ayant survécu à une injection de culture mixte ne sont pas immunisés de ce fait. Ils meurent de charbon injecté à forte dose quelque temps après.

CONCLUSIONS

1° Le bacille de Friedländer, injecté en même temps que le bacille du charbon, exerce une action nettement antagoniste et permet souvent de sauver l'animal. Les résultats ont été surtout démonstratifs sur le cobaye à qui nous avons injecté les deux micro-organismes sous la peau; ils ont été moins nets pour le lapin, la souris inoculée avec les deux microbes meurt généralement de septicémie à Friedländer; le bacille du charbon ne se retrouve plus à l'autopsie.

2° Le bacille typhique d'Eberth a également une action nettement antagoniste que nous avons constatée sur le cobaye et sur la souris, de même que sur le lapin.

3° Le *Bacterium coli* est un antagoniste du *Bacillus anthracis*; ici aussi c'est l'inoculation sous-cutanée qui a donné les résultats les plus concluants.

4° Une culture du bacille paratyphique B, de notre collection, n'a pas exercé une action antagoniste aussi nette; les animaux d'expérience sont morts après les témoins inoculés avec le charbon seul. A l'autopsie nous avons généralement retrouvé les deux microbes.

5° Nous avons pu confirmer les résultats concernant les propriétés antagonistes du bacille pyocyanique sur les trois espèces d'animaux ayant servi à nos expériences.

6° Les propriétés antagonistes sont surtout nettes lorsque les deux microbes ont été injectés simultanément au même point. Elles ne se manifestent pas toujours lorsque la deuxième culture est inoculée à une certaine distance.

7° Lorsque les deux cultures sont inoculées à huit heures d'intervalle nous n'avons plus pu constater d'antagonisme: les animaux meurent de charbon.

8° L'action antagoniste, si nette lorsque l'on injecte les cultures vivantes, ne se manifeste pas lors de l'injection de bacilles tués par la chaleur.

9° La résistance à l'injection simultanée de charbon et de Friedländer ou de typhique ne confère pas l'immunité vis-à-vis d'une infection charbonneuse ultérieure.

Des expériences relatées dans ce travail il ressort qu'il est possible de neutraliser l'action d'une dose sûrement mortelle de bacille du charbon en inoculant simultanément une culture vivante d'un microbe antagoniste. Il n'y a pas de relation directe entre l'action empêchante *in vivo* et l'antagonisme *in vitro*. Le bacille pyocyanique agit sur le bacillus anthracis dans la culture (pyocyanase); c'est à cette action dissolvante qu'on a attribué le pouvoir antagoniste *in vivo*. Le bacille de Friedländer, par contre, n'a pas de pouvoir antagoniste sur les cultures de charbon *in vitro* et cependant il agit d'une façon très nette sur l'animal.

L'infection mixte a fait l'objet de nombreux travaux en tant que facteur aggravant. Les propriétés des cultures du bacille pyocyanique ont motivé l'emploi de la pyocyanase contre diverses infections. Le rôle *empêchant* de certains micro-organismes, relevé par Metchnikoff pour le choléra expérimental et pour les infections intestinales, n'a pas encore été suffisamment étudié. Il est probable que l'étude de cette question nous permettra d'élucider maint problème dans le domaine de l'immunité et de la prédisposition.

TABLEAUX DES EXPÉRIENCES

Nota. — La plupart des inoculations ont été faites simultanément et au même point, soit sous la peau, soit, plus rarement, dans la veine ou dans le péritoine; les injections effectuées en des points différents ou à intervalles sont indiquées dans la colonne « mode d'infection ». — Pour les animaux qui ont succombé nous indiquons la durée de la survie, de même que pour les témoins inocués avec un seul des microbes; S. signifie que le témoin a survécu. — Le résultat de l'examen du sang et de la rate est enregistré dans la rubrique « autopsie ».

TABLEAU I. — Charbon et Friedländer.

NUMÉROS	MODE D'INFECTION	NOMBRE	SURVIE	MORT (durée de la survie)	AUTOPSIE	TÉMOINS		OBSERVATIONS
						Charb.	Friedl.	
1	Sous-cutanée.	1	1	»	»	4	2	
2	— 2 points différents.	1	1	»	»	4	2	
3	Sous-cutanée.	1	1	»	»	»	»	
4	— 2 points différents.	1	»	1 (3)	Friedländer.	2	S.	
5	a) Sous-cutanée	1	1	»	»	2	1	
6	b) Charbon 8 jours après.	1	»	1 (4)	Charbon.	2	S.	
7	Sous-cutanée	2	1	1 (19)	Friedländer.	2	»	Survie de 17 j.
8	—	1	1	»	»	2	S.	
9	—	1	1	»	»	3	S.	
10	—	1	1	»	»	3	S.	
11	— 2 points différents	1	1	1 (2)	Friedländer.	2	»	Dose de Friedl. trop forte.
12	Sous-cutanée	2	1	»	»	»	»	
13	—	1	1	»	»	»	»	
14	Charb. sous-cut., Friedl. intrav.	1	»	1 (1 1/2)	Charbon.	1 1/2	»	
15	Charb. intrav., Friedl. sous-cut.	1	»	1 (1 1/2)	Friedländer et Charbon.	1 1/2	»	
16	Sous-cutanée	1	»	1 (1 1/2)	Charbon et Friedländer.	»	»	
17	Intraveineuse.	1	»	1 (1 1/2)	Charbon et Friedländer.	»	»	
18	Sous-cutanée	1	»	1 (2 1/2)	Charbon et Friedländer.	»	»	
19	Charb. sous-cut., Friedl. intrav.	1	»	1 1/2	Charbon et Friedländer.	1 1/2	S.	
20	Sous-cutanée	1	»	1 (2 1/2)	Charbon.	»	»	
21	Friedl. intrav., Charb. sous cut.	1	»	1 (2)	Charbon et Friedländer.	1 1/2	S.	
22	Sous-cutanée	1	»	1 (1)	Charbon et Friedländer.	1	3	
23	— 2 points différents.	1	»	1 (1)	Friedländer.	1	3	
24	Infection superficielle.	2	»	2 (4 et 21)	Friedländer.	2 1/2	7 1/2	
25	Sous-cutanée	1	»	1 (3)	Charbon et Friedländer.	2 1/2	2 1/2	
26	— 2 points différents.	1	»	1 (3 1/2)	Friedländer.	2 1/2	2 1/2	
27	Sous-cutanée	2	»	2 (3 1/2, 4 1/2)	Friedländer.	6 1/2	4 1/2	

TABLEAU II. — Charbon et bacille typhique.

NUMÉROS	MODE D'INFECTION	NOMBRE	SURVIE	MORT (durée de la survie)	AUTOPSIE	TÉMOINS		OBSERVATIONS
						Charb.	B. typh.	
3	Sous-cutanée	1	1	"	"	2	1	Survie 13 jours.
4	—	1	"	1 (1/2)	B. typhique.	2	S.	
8	—	2	"	2 (3/4, 5 1/2)	Pas de charbon.	2	S.	
10	—	1	1	"	"	3	S.	
11	—	2	2	"	"	2	"	Survie 6 jours.
16	—	1	"	1 (1/2)	B. typhique.	1 1/2	"	
18	Intraveineuse.	1	"	1 (1 1/2)	Id.	"	"	
21	Intrapéritonéale.	1	"	1 (3/4)	Id.	9 1/2	"	
24	Sous-cutanée à 8 h. d'intervalle.	1	"	1 (1 1/2)	Charbon et B. typhique.	1	"	Survie 6 jours.
27	—	1	"	1 (3 1/2)	Id.	2 1/2	"	
27	—	1	"	1 (2)	B. typhique.	1 1/2	"	
26	—	1	"	1 (8 1/2)	Pas de charbon.	1	"	
6	Sous-cutanée	1	1	"	"	1	"	Survie 6 jours.
7	—	1	"	1 (5)	"	1	S.	
7	—	1	1	"	"	"	"	
8	Infection superficielle.	1	1	"	"	2 1/2	S.	
12	Sous-cutanée	2	1	1 (3)	Charbon.	S.	"	Survie 6 jours.
13	—	2	2	"	"	6 1/2	S.	
13	—	1	1	"	"	3	"	
17	—	2	"	2; 2 1/2, 4 1/2	B. typhique.	8	"	
27	Intrapéritonéale.	2	"	2 1/2, 2 1/2	B. typhique.	1	2 1/2	Survie 6 jours.
12	Sous-cutanée 2 points différents.	2	"	2 (3 1/2)	"	1 1/2	10	
19	Sous-cutanée.	1	1	"	Charbon.	1 1/2	"	
19	Intraveineuse.	1	"	1 (4)	?	1 1/2	3 1/2	
20	Typh. intrav. Charb. sous-cut.	1	"	1 (2 1/2)	B. typhique et charbon.	2 1/2	3 1/2	Survie 6 jours.
20	Intraveineuse.	1	"	1 (8 1/2)	B. typhique.	6	"	
26	—	1	"	1 (3 1/2)	Pas de charbon.	4	"	
26	—	1	"	1 (3 1/2)	"	4	"	

TABLEAU III. — Charbon et Paratyphique B.

NUMÉROS	MODE D'INFECTION	NOMBRE	SURVIE	MORT (durée de la survie)	AUTOPSIE	TÉMOINS		OBSERVATIONS
						Charb.	Para B	
9	Sous-cutanée	1	"	1 (2 1/2)	Charbon et Para B.	2 1/2	"	
24	—	1	"	1 (6)	Charbon.	2 1/2	"	
25	— 2 points différents.	1	"	1 (1 1/2)	Charbon.	1 1/2	"	
Charbon intrapéritonéal. Paratyphique B sous-cutané. . . .		1	"	1 (3 1/2)	Charbon.	1 1/2	"	
9	Sous-cutanée.	1	"	1 (2)	Charbon et Para B.	2 1/2	"	
27	— 2 points différents.	2	1	1 (4 1/2)	Para B.	1 1/2	"	
Intraveineuse.		1	"	1 (3 1/2)	Charbon et Para B.	"	"	
Sous-cutanée.		1	"	1 (2 1/2)	Charbon et Para B.	2	"	

(cobayes.)

(souris.)

(lapin.)

TABLEAU IV. — Charbon et *Bacterium coli*.

NUMÉROS	MODE D'INFECTION	NOMBRE	SURVIE	MORT (durée de la survive)	AUTOPSIE	TÉMOINS Charb. <i>B. coli</i>	OBSERVATIONS
27	Sous-cutanée.	1	"	1 (2)	<i>B. coli</i> .	1 1/2	"
3	—	1	1	"	"	2	S.
4	—	1	1	"	"	"	"
18	Intraveineuse.	1	"	1 (2)	"	"	2
21	Intrapéritonéale.	1	"	1 (2) 1/2	Charbon et <i>B. coli</i> .	9 1/2	"
25	Sous-cutanée 8 h. d'intervalle.	1	"	1 (2) 1/2	Charbon.	1	"
	Sous-cutanée.	1	"	1 (2)	<i>B. coli</i> et charb. dans les org.	1 1/2	"
26	— 2 points différents.	1	"	1 (2)	(Charbon.	1 1/2	"
6	Sous-cutanée 2 points différents.	1	"	1 (2)	<i>B. coli</i> .	1 1/2	"
	Sous-cutanée.	1	"	1 (1 1/2)	"	1	"
12	— 2 points différents.	1	1	1 (1 3/4)	<i>B. coli</i> .	1	3
	—	1	1	"	(Charbon.	1	"
	— (Charb.) et intrapériton.				"	"	"
	<i>B. coli</i> .	1	"	1 (7 1/2)	Charbon.	6 1/2	"
13	Sous cutanée.	1	"	1 (3)	Charbon.	"	"
25	Intrapéritonéale.	1	"	1 (1)	<i>B. coli</i> .	"	"
	Sous-cutanée.	1	"	1 (2)	(Charbon.	1 1/2	"
	—	1	1	"	"	"	"
24	Charb. sous-cut., <i>B. coli</i> intrav.	1	"	1 (3)	Charbon.	2	"
26	Intraveineuse.	1	1	"	"	4	"
20	—	1	"	1 (2)	<i>B. coli</i>	6	S.

TABLEAU V. — Charbon et Pyocyanique.

NUMÉROS	MODE D'INFECTION	NOMBRE	SURVIE	MORT (durée de la survie)	AUTOPSIE	TÉMOINS		OBSERVATIONS
						Charb.	Pyocyaniq.	
Colaptes 5 8 41 25	Sous-cutanée	1	"	1 (3)	Pyocyanique.	2	T.	
	—	1	"	1 (3 1/2)	Pas de charbon.	2	T.	
	2 points différents	1	"	1 (2 1/2)	"	2	T.	
	—	2	2	"	"	2	"	
	2 points différents	1	"	1 (3 1/2)	Charbon et Pyocyanique.	1 1/2	T.	
Souris 12 17 21 25	Charb. intrapérit. Pyoc. sous-cut.	1	"	1 (1 1/2)	(Charbon.	1 1/2	"	
	Sous-cutanée	2	2	"	"	6	T.	
	Intrapéritonéale	1	"	1 (1 1/2)	Pyocyanique.	4	"	
	Pyoc. intrapérit., Charb. s. cut.	1	"	1 (1 1/2)	Pyocyanique.	8	"	
	Pyoc. s.-cut., Charb. intrapérit.	1	"	1 (1 1/2)	Charbon.	1 1/2	"	
Lapins 16 49 26	Pyoc. intrapérit., Charb. s.-cut.	2	"	2 (1 1/2, 1 1/2)	Charbon et Pyocyanique.	1 1/2	1 1/2	
	Sous-cutanée	1	"	1 (1 1/2)	Charbon.	1 1/2	"	
	Intrapéritonéale	1	"	1 (1)	Pyocyanique.	1 1/4	T.	
	Sous-cutanée	1	"	1 (10)	Pas de charbon.	1 1/2	"	Mort de pseudo-tuberculose.
	Intraveineuse	1	1	"	"	1 1/2	"	
	Pyoc. intrav., Charbon sous-cut.	1	"	1 (2)	Charbon et Pyocyanique.	1 1/2	"	
	Intraveineuse	1	1	"	"	4	"	

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES INFECTIONS INTESTINALES

LE *BACILLUS BOOKERI*

par H. TISSIER.

Les travaux sur la flore microbienne intestinale occupent une large place dans l'œuvre de Metchnikoff. Cet esprit aux idées si larges voyait dans la prolifération d'espèces étrangères à la flore normale non seulement la cause des troubles digestifs, mais encore celle de la plupart de nos déchéances organiques. On sait avec quelle énergie il sut défendre ces idées et diriger de nombreux élèves dans ces intéressantes recherches.

Il ne semblait pas, après les discussions du Congrès de médecine de 1900, après les nombreux travaux parus de tous côtés, qu'on pût mettre en doute l'origine microbienne de la plupart des troubles digestifs de l'homme. Et pourtant, dès 1912, les travaux de l'École allemande et ceux d'une certaine partie de l'École française tendaient à leur chercher une autre cause.

C'était pourtant un fait connu, démontré, que dans tous les troubles digestifs qui ne sont pas d'origine toxique, on peut trouver, dans les selles, des microbes autres que ceux qui composent la flore normale. Ces espèces sont évidemment variées, mais elles apparaissent avec les premiers symptômes de la maladie et disparaissent avec elle (1).

Ce que nous savions encore, c'est que ces bactéries anormales ne pouvaient s'installer d'emblée dans notre intestin, qu'il fallait une sorte de préparation chimique du milieu et un bouleversement des défenses de la flore normale. Nous avions

(1) TISSIER, *Thèse de Paris* 1900, et *Ces Annales*, 20, février 1903 et 22, mai 1903.

souvent observé qu'une fermentation putride précédait la pullulation d'espèces plus pathogènes.

Mais ce qui restait à démontrer, c'est le mode d'action de ces microbes. On ne parvenait pas à reproduire chez l'animal le symptôme des maladies observées. L'ingestion des cultures ne produisait aucun trouble chez nos animaux de laboratoire.

Metchnikoff, que cette question passionnait, eut l'idée d'utiliser pour ses expériences, non plus les cobayes et les lapins dont la flore intestinale est si différente de celle de l'homme, mais des singes et plus spécialement des anthropoïdes qui ne présentent pas cet inconvénient. On sait qu'il parvint ainsi à reproduire le choléra infantile, levant ainsi le dernier doute sur l'origine microbienne de ces troubles digestifs (1).

On peut schématiquement grouper ces infections intestinales en trois catégories : les *infections putrides, catarrhales et pyrétiques*.

Dans le premier cas, on trouve dans les matières fécales tous les éléments nécessaires à une putréfaction vraie. On peut en isoler des bactéries protéolytiques ferments mixtes : *B. perfringens* et ferments simples : *B. sporogenes* (2), *B. colicogenes* (3) associées ou non à des espèces moins actives : *Coccobacillus perfærens* (4), *Micrococcus parvulus* (5), *B. saccharobutyricus*, *B. bavati* (6) qui semblent surtout agir par leur produits de fermentation.

Les douleurs abdominales plus ou moins localisées, les coliques par crises plus ou moins violentes, les selles molles, fréquentes, accompagnées de glaires et d'émission de gaz fétides en sont les symptômes dominants. En modifiant le milieu chimique qui fait vivre ces microbes, on modifie plus ou moins vite les symptômes de la maladie.

Dans les infections pyrétiques, aux troubles fonctionnels que nous venons de décrire s'ajoutent un état saburral particulier et des phénomènes généraux, de la fièvre. A côté des bactéries putrides anaérobies se développe une abondante flore du type

(1) METCHNIKOFF. Ces *Annales*, 1914, n° 2.

(2) METCHNIKOFF. Ces *Annales*, 22, décembre 1908.

(3) TISSIER. Ces *Annales*, juillet 1912, p. 522.

(4) TISSIER. *Thèse de Paris*, 1900.

(5) VELLON et ZUBER. *Arch. méd. exp.*, juillet 1898, n° 4.

(6) TISSIER. *Soc. de Biol.*, 1918, n° 8.

B. coli dont l'action élective se porte sur les produits de dédoublement des albumines. Ces microbes produisent des corps nuisibles à l'organisme et sont capables de pénétrer dans la circulation générale créant ainsi des septicémies plus ou moins tenaces. Ce sont les *paratyphiques A* et *B* qui forment les éléments les plus connus de cette catégorie dans laquelle il faudrait également mettre toute cette série de *B. paracoli* mis en lumière par les travaux des Écoles anglaise et américaine.

Dans les infections catarrhales, l'action microbienne porte surtout sur la muqueuse. Tout indique qu'elle est fortement touchée : selles glaireuses, diarrhéiques mélangées de sang ou de muco-pus dont l'émission s'accompagne de ténésme, de brûlures, sensation de griffe, etc. Parfois même la diarrhée est profuse et on voit paraître des phénomènes généraux graves.

C'est dans cette classe qu'il faut ranger les dysenteries bacillaires, les entérites cholériformes, le choléra infantile, etc. Les recherches bactériologiques faites pendant la guerre ont montré la grande variété des bacilles dysentériques. Des microbes dissemblables peuvent donc produire des troubles digestifs identiques. Il est bien probable qu'il en est de même pour les diarrhées estivales des jeunes enfants.

Metchnikoff considérait le *B. proteus vulgaris* comme étant la cause la plus fréquente, sinon l'unique, de ces infections (1). C'était déjà l'opinion de Booker en 1897. Eschereck et Vargas en 1900 lui attribuaient un rôle important.

Il nous semble également que son action sur l'intestin ne peut être négligeable. Lors de l'épidémie de choléra infantile de 1900 nous l'avions fréquemment isolé des selles des nourrissons très gravement atteints; mais il est bon d'ajouter que nous l'avons rencontré dans des cas dont l'allure clinique ne rappelait en rien ces formes graves. Il existe également dans des selles d'enfants ne présentant que des indispositions légères.

À côté du *B. proteus vulgaris* nous devons placer une espèce plus rare en nos contrées, dont les caractères morphologique et clinique sont différents, mais dont l'action nocive est voisine : c'est le *B. bookeri* décrit par Ford en 1903 (2).

(1) METCHNIKOFF. Ces Annales, 1914, n° 2.

(2) W. W. FORD. *Studies from the royal Vict. Hosp.*, Montréal, 1, n° 5.

La description donnée par cet auteur est malheureusement très succincte et nous croyons nécessaire d'en donner une étude plus approfondie.

Il se présente au microscope sous l'aspect d'un coccobacille rappelant les formes banales du *B. coli*. Il est de même dimension et fixe également les colorants à ses extrémités. Il ne donne pas, par contre, de forme d'involution dans les vieilles cultures. Il est immobile. Sa vitalité est assez considérable, on peut le repiquer d'une culture en bouillon ordinaire vieille d'un mois ou d'une culture en gélatine datant de quatre mois et demi.

C'est un anaérobie facultatif se développant aussi bien à 37° qu'à 22°.

Sur gélose ordinaire il donne des colonies analogues à celles du *B. coli* qui prennent aussi en vieillissant une teinte café au lait. Elles virent légèrement le milieu de Drigalski. Ensemencée en gélose profonde cette espèce disloque le milieu par une abondante production de gaz. Elle liquéfie lentement la gélatine sans donner de colonies migratrices, mais, chose curieuse, elle communique à ce milieu liquéfié une teinte acajou. Le lait est coagulé lentement en fins grumeaux et le sérum prend une coloration jaunâtre. Sur pomme de terre elle se développe assez bien donnant une colonie peu épaisse de teinte marron clair. Tous les milieux amidonnés brunissent également. Les milieux à la tyrosine prennent, au bout de quelques jours, une coloration rose.

Ses propriétés chimiques sont plus spéciales. Ce bacille, en effet, n'attaque pas l'amidon et très faiblement les sucres. Il ne donne jamais de fermentation acide dans les milieux peptonés contenant du glucose, ou un autre sucre : lactose, saccharose, lévulose, galactose, mannite, dulcite. Le lait seul donne, après sa coagulation, une faible acidité qui disparaît par la suite. Si nous dosons les sucres de tous ces milieux nous voyons qu'environ un tiers a été détruit. Cette attaque a donc été insidieuse et lente, elle est insignifiante si on la compare à celle des matières protéiques.

Nous avons vu qu'il liquéfiait la gélatine, il attaque également les albuminoïdes et les protéines. Il était intéressant de mesurer son pouvoir protéolytique et nous l'avons mis en milieu

peptoné contenant des quantités connues d'albumine animale ou végétale. Dans les deux cas, la bactérie avait utilisé les peptones et les acides aminés du milieu, délaissant les albumines. Dans le lait son action protéolytique est plus nette : un tiers de la caséine est détruite.

Son action élective se porte donc sur les dérivés des matières protéiques : albumoses, peptones, acides aminés, mais elle est loin d'être aussi intense que celle du *B. proteus vulgaris*, elle ne fait pas disparaître des milieux peptonés la réaction du buriel et ne donne ni indol, ni phénol.

C'est donc un *ferment protéolytique simple* ; mais comme le sont ordinairement les aérobies. Ces bactéries ne brisent pas en gros morceaux la molécule albuminoïde comme le font les grands anaérobies de la putréfaction, laissant les sous-produits à des microbes accessoires, ils la dissocient lentement jusqu'à l'ammoniaque comme le fait le *B. pyocyaneus*.

Le *B. bookeri* est, enfin, pathogène pour les animaux de laboratoire. Un demi-centimètre cube de culture de bouillon ordinaire tue la souris en douze heures et 1 cent. cube inoculé sous la peau provoque, chez le cobaye, des troubles généraux dont il ne se relève que lentement. La même dose mise dans le péritoine tue l'animal en quelques heures.

Ce bacille peut également causer des troubles digestifs quand il est mélangé aux aliments. Pendant cinq jours de suite, nous avons donné à un chimpanzé de trois ans environ 10 cent. cubes d'une culture liquide mélangée à du lait. Trois jours après l'animal a perdu l'appétit et a eu des selles molles peu liquides et enfin glaireuses au nombre de huit à dix dans la journée. Au bout d'une quinzaine de jours seulement les troubles digestifs se sont atténués et ont disparu lentement.

Nous avons essayé de déterminer son mode d'action. Nous avons d'abord inoculé sous la peau d'un cobaye des cultures filtrées sur bougie; 1 cent. cube produisait un malaise évident qui ne disparaissait qu'en trois ou quatre jours. Par contre la même dose, dans le péritoine, tuait rapidement l'animal. Des corps microbiens recueillis comme l'indique Nicolle et délayés dans l'eau physiologique (3 grammes pour 10 cent. cubes) inoculés sous la peau à la dose de 1 cent. cube n'ont fait qu'indisposer l'animal, tandis qu'ils l'ont tué quand ils ont été mis dans

le péritoine. Ainsi corps microbiens et produits de culture sont également nuisibles. Le *B. proteus vulgaris* donne des toxines douze fois moins actives, mais les poisons adhérents aux corps microbiens tuent plus rapidement l'animal.

Il est donc bien probable que les troubles observés chez les enfants « porteurs de ce germe » : *B. bookeri*, étaient imputables à cette espèce. C'étaient d'abord de l'inappétence, puis des lourdeurs d'estomac, des digestions pénibles, des selles molles et enfin de la diarrhée glaireuse (8 à 10 selles dans les vingt-quatre heures) avec de légères coliques et enfin de la dépression, de l'amaigrissement, mais toujours sans fièvre.

Dans quelle condition cette espèce peut-elle se développer dans le tube digestif? Il semble, d'après les quelques observations que nous possédons, qu'une préparation du milieu chimique lui est nécessaire. Il faut qu'il se produise dans les déchets digestifs, au moins un début de putréfaction. Nous avons toujours trouvé dans ces selles diarrhéiques du *B. perfringens*, côte à côte avec notre bacille. Nous avons alors cherché à donner une alimentation dont aucun déchet ne puisse être utilisé par cet anaérobie. Peu à peu, nous sommes arrivés, ainsi, à l'éliminer de la flore intestinale; or, en même temps que lui, disparaissait le *B. bookeri*.

Nous vîmes, alors, diminuer puis disparaître tous les troubles dont se plaignaient nos jeunes malades, et nous ne pûmes jamais par la suite isoler, de leurs selles, l'une ou l'autre de ces deux bactéries.

Comme on le voit, tout rappelle dans ce genre d'infection ce qui se passe dans les infections légères à *B. proteus vulgaris*.

On doit donc la placer côte à côte dans la nosographie des maladies digestives.

ROLE DES HÉMOLYSINES DANS L'INTOXICATION MICROBIENNE

par M. WEINBERG et M. NASTA.

Un grand nombre de microbes pathogènes sécrètent, à côté d'autres substances toxiques, des hémolysines. Bien que ces dernières aient déjà fait l'objet de nombreux travaux, nous ne sommes pas encore fixés sur la part qui leur revient dans l'intoxication générale de l'organisme au cours d'une infection.

Nous avons essayé de combler cette lacune, en étudiant comparativement la toxine totale de quelques microbes et la même toxine débarrassée de ces substances hémolytiques.

Par « toxine totale » il faut comprendre l'ensemble des substances toxiques que renferme la partie liquide et claire d'une culture bien centrifugée. Nous nous sommes servis presque exclusivement de la toxine non filtrée : le filtre Chamberland même peu serré, comme la bougie L 2 par exemple, retient une grande partie de l'hémolysine.

Les toxines étudiées sont celles du *B. perfringens*, du vibron septique, du staphylocoque doré et du streptocoque.

Les animaux d'expérience ont été, pour la plupart, injectés dans la veine, car c'est par cette voie que l'effet des hémolysines est le plus brutal et par conséquent le plus nettement appréciable.

Deux procédés ont été employés pour priver la toxine de son pouvoir hémolytique : le procédé classique qui consiste à saturer la toxine par des globules rouges en excès, et le procédé de neutralisation par le sérum normal, dont les propriétés anti-hémolytiques sont connues depuis les travaux d'Ehrlich.

C'est l'analyse des résultats obtenus dans cette dernière

partie de nos recherches qui nous a permis d'apporter quelques notions précises sur les propriétés curatives du sérum normal de cheval ainsi que sur les effets non spécifiques de certains sérums antitoxiques ou antimicrobiens.

TECHNIQUE

A. — L'hémolysine microbienne est obtenue par centrifugation de trois à dix minutes (centrifugeur Jouan n° 2) des cultures microbiennes en bouillon glucosé à 1 p. 1.000. Lorsque les microbes sont auto-agglutinants (streptocoque, bactériidie charbonneuse), on remplace avantageusement la centrifugation par la filtration sur papier durci, stérilisé à l'autoclave.

Pour les hémolysines du *B. perfringens*, du vibron septique et du streptocoque, employer les cultures jeunes (quatorze à dix-huit heures); pour celle du staphylocoque les cultures de cinq à six jours. Pour préparer la streptococcolysine, ensemercer le bouillon avec le streptocoque conservé en bouillon-sérum.

L'unité hémolytique d'une toxine microbienne est la quantité de toxine capable d'hémolyser, au bout d'une heure d'étuve à 37°, 1 cent. cube de globules rouges (5 p. 100) d'une espèce donnée. L'indice hémolytique représente le nombre d'unités hémolytiques contenues dans 1 cent. cube de toxine.

L'indice hémolytique de la toxine du *B. perfringens* était dans nos expériences de 30 à 50 (globules de cobayes); l'hémolysine de vibron septique a donné l'indice 0 à 10; la staphylocoque, 10 à 20 pour les globules de cobaye et 80 à 100 pour ceux de lapin. La streptococcolysine marquait 3 à 20.

B. — Pour établir l'indice antihémolytique, on verse dans une série de tubes renfermant une unité d'hémolysine microbienne des doses décroissantes (1/10 à 1/1.000 [de cent. cube) du sérum étudié. L'hémolysine et le sérum doivent être dilués dans de l'eau physiologique, de façon que les doses employées dans l'expérience soient de 0 c.c. 1.

Les tubes sont mis à l'étuve à 37° pendant une heure. Au bout de ce temps, on ajoute 1 cent. cube de globules rouges (à 5 p. 100) et on remet les tubes à l'étuve. Les résultats sont notés au bout de deux heures.

La limite du pouvoir antihémolytique du sérum est indiquée par le tube renfermant la plus petite quantité de sérum empêchant complètement l'hémolyse, c'est-à-dire par le dernier tube dans lequel le liquide surnageant les globules rouges reste absolument incolore. Si, par exemple, ce dernier tube contient 0 c.c. 1 du sérum dilué au 1/10, l'indice antihémolytique sera 100.

C. — Pour priver une toxine microbienne de son hémolysine, il n'est nullement nécessaire de la mettre en contact avec des globules rouges en excès. Prenons, par exemple, une toxine du *B. perfringens* à indice hémolytique 50 pour les globules de cobaye. Les 10 cent. cubes de cette toxine renfermant 500 unités hémolytiques, on devrait, pour enlever toute trace d'hémolysine, les mettre en contact avec un culot globulaire provenant de la centrifugation de 500 cent. cubes de globules rouges à 5 p. 100 ou bien, ce qui revient au même, avec un culot globulaire de 25 cent. cubes de sang défibriné et lavé. En réalité, la toxine est déjà complètement privée de son

hémolysine après contact avec une quantité de globules rouges trois fois moindre (culot globulaire de 8 cent. cubes de sang).

Il n'est pas non plus nécessaire de prolonger le contact de la toxine avec les globules rouges. La fixation de l'hémolysine sur les globules rouges se fait très rapidement. Il suffit de verser dans un tube à centrifuge renfermant un culot de sang centrifugé et lavé la quantité de toxine à laquelle on veut enlever toute son hémolysine, de bien mélanger et de centrifuger immédiatement (trois à cinq minutes). La toxine, décantée aussitôt après la centrifugation, est complètement privée de son hémolysine, bien que, dans ce procédé, la quantité de sang laqué soit bien inférieure à celle qu'on trouve après un contact prolongé du mélange toxine globules rouges à l'étuve ou à la glacière.

Cette fixation très rapide de l'hémolysine sur les globules rouges a été constatée pour toutes les hémolysines microbiennes étudiées.

Hémolysine du *B. Perfringens*.

Toutes les souches du *B. perfringens* produisent une hémolysine très active. Il arrive exceptionnellement qu'une souche, d'ordinaire hémolytique, provoque chez l'homme ou chez les animaux un œdème blanc avec peu de gaz ou sans gaz; mais les conditions qui favorisent la production par ce microbe de toxine uniquement non hémolytique ne sont pas encore déterminées et il est impossible de reproduire à coup sûr un œdème blanc avec une souche donnée de cet anaérobie.

Lorsqu'on injecte dans la veine d'un cobaye de 400 grammes 1 à 2 cent. cubes de toxine centrifugée du *B. perfringens* riche en hémolysine, l'animal meurt tantôt en quelques minutes, tantôt en une ou quelques heures. Si la mort n'est pas foudroyante, l'animal présente, en dehors d'autres symptômes (dyspnée, poil hérissé, soubresauts), une ou plusieurs crises d'hémoglobinurie dont la première survient quelquefois déjà 15 minutes après l'injection. Cette hémoglobinurie est la conséquence de la destruction intense des globules rouges *in vivo*, comme l'avaient montré les recherches de Guyonnet (1) qui a constaté chez les cobayes injectés une chute globulaire pouvant aller de 6.000.000 à 1.200.000. L'hématurie qui avait été signalée par M^{lle} Raphaël ne vient compliquer l'hémoglobinurie qu'au bout de 2 à 3 heures.

(1) G. GUYONNET, Les hémolysines bactériennes. Thèse de Bordeaux, 1919. — La destruction des globules rouges *in vivo* à la suite de l'injection de toxine du *B. perfringens* a déjà été notée par Bull et Pritchett (1917) dans leurs expériences sur le lapin.

Les constatations faites à l'autopsie : exsudat hémoglobinique de la plèvre, du péricarde, du péritoine; congestion intense des viscères abdominaux; vessie noire, rétractée ou bien distendue par l'urine riche en hémoglobine et souvent en globules rouges; quelquefois petites taches noires ou même infarctus hémorragiques du poumon ailleurs complètement blanc, ne font que souligner l'importance des lésions du sang causées *in vivo* par l'hémolysine du *B. perfringens*.

D'ailleurs les expériences pratiquées avec la toxine de ce microbe, complètement privée de son hémolysine par le procédé du contact avec les globules rouges, montrent nettement que l'hémolysine joue un rôle primordial dans l'intoxication générale de l'organisme, lorsque l'animal est injecté par voie veineuse, et cela, que la mort soit foudroyante ou bien qu'elle survienne une ou quelques heures après l'injection.

Deux cobayes (460 et 490 grammes) reçoivent dans la veine, chacun 2 cent. cubes de toxine du *B. perfringens* à indice hémolytique 150. Ces deux cobayes sont pris immédiatement de convulsions et meurent l'un en deux, le deuxième en cinq minutes. Deux autres témoins (375 et 295 grammes), ayant reçu seulement 1 cent. cube de toxine, sont pris de secousses, se remettent, mais meurent l'un en quelques heures, l'autre en vingt heures.

Deux nouveaux cobayes pesant chacun 450 grammes reçoivent également dans la veine 2 cent. cubes de toxine débarrassée complètement de son hémolysine par le procédé du contact avec les globules rouges; ils présentent quelques secousses, mais se remettent complètement.

Dans une autre expérience, où le témoin est mort en sept heures, deux cobayes sont injectés avec 2 et 5 cent. cubes de toxine débarrassée de son hémolysine. L'animal, injecté avec 5 cent. cubes, a présenté quelques secousses, a émis de l'urine franchement rouge, mais s'est remis complètement.

Les petites secousses et l'émission d'urine quelquefois franchement hémoglobiniques observées chez les cobayes injectés avec la toxine privée de son hémolysine sont dues à la richesse de cette toxine en hémoglobine dissoute. Nous avons observé maintes fois ces symptômes chez les cobayes témoins, injectés avec la quantité correspondante d'hémoglobine obtenue par hémolyse des globules rouges du cobaye avec de l'eau distillée, l'isotonie ayant été assurée par l'addition de quantité convenable de chlorure de sodium.

Ces faits établis, nous avons recherché si le sérum normal de cheval, doué de propriétés anti-hémolytiques, ne serait pas

capable, lui aussi, de neutraliser la toxine du *B. perfringens* étudiée sur cobaye, comme il a été observé dans les expériences analogues faites sur souris (Weinberg et Séguin).

Nous avons d'abord étudié le pouvoir anti-hémolytique du sérum de cheval vis-à-vis de la toxine du *B. perfringens*. L'expérience, pratiquée comparativement avec le sérum de 20 chevaux neufs et un certain nombre de sérums spécifiques préparés à l'Institut Pasteur, a donné, pour les globules rouges de cobaye, les résultats suivants :

Le sérum de cheval neuf neutralise toujours l'hémolysine du *B. perfringens* vis-à-vis des globules rouges du cobaye : son indice anti-hémolytique varie de 50 à 500. L'indice anti-hémolytique des sérums spécifiques, préparés contre d'autres microbes que le *B. perfringens*, présente les mêmes variations que l'indice du sérum de chevaux neufs.

L'indice anti-hémolytique du sérum anti-*perfringens* antimicrobien est à peine plus élevé que l'indice le plus élevé de sérums normaux. Le sérum antitoxique anti-*perfringens* a donné les chiffres les plus élevés; il est 20 à 60 fois supérieur à l'indice de sérum normal.

Faisons maintenant une expérience comparative de la neutralisation *in vivo* de la toxine du *B. perfringens*, avec un sérum de cheval normal et un sérum spécifique.

Deux cobayes (355 et 400 grammes) reçoivent dans la veine, le premier, le mélange de 2 cent. cubes de toxine centrifugée de *B. perfringens* et de 0 c. c. 5 de sérum normal de cheval; le deuxième, la même quantité de toxine avec seulement 0 c. c. 2 de sérum normal. Les deux cobayes survivent, le deuxième ayant présenté une légère crise d'hémoglobinurie.

Trois cobayes (295, 360 et 295 grammes) sont injectés avec 2 cent. cubes de toxine mélangée à des doses croissantes (1/20, 1/30, 1/50 de cent. cube) de sérum antitoxique, anti-*perfringens*. Les deux premiers survivent, le troisième succombe en deux minutes.

Les cobayes (440 et 470 grammes) du troisième lot reçoivent dans la veine, l'un le mélange de 2 cent. cubes de culture de *B. perfringens* et de 0 c. c. 5 de sérum normal, l'autre, le mélange de 2 cent. cubes de culture et de 1/20 de cent. cube de sérum (anti-*perfringens*). Les deux cobayes survivent.

Enfin, les cobayes témoins (595, 590, 520 et 420 grammes), injectés dans la veine avec 2 cent. cubes de toxine seule meurent en une heure, trois heures et demie et cinq heures. Un autre témoin de 550 grammes n'ayant reçu que 1 cent. cube meurt en trois heures; enfin, le dernier cobaye témoin injecté dans la veine avec 2 cent. cubes de culture, meurt dans la nuit.

Cette expérience est démonstrative; elle signifie que le pouvoir neutralisant du sérum de cheval, normal ou spécifique, est nettement proportionnel à son pouvoir anti-hémolytique vis-à-vis de l'hémolysine du *B. perfringens*.

En effet, nous avons utilisé dans cette expérience un sérum normal à indice anti-hémolytique 100 et le sérum spécifique à indice 2.000, c'est-à-dire 20 fois plus actif. Or, pour protéger un cobaye contre l'action de 2 cent. cubes de toxine, il fallait 0 c. c. 2 de sérum normal et une dose de sérum spécifique comprise entre 1/30 et 1/50 de cent. cube, c'est-à-dire à peu près 20 fois plus faible.

L'intérêt de nos observations est encore accru par le fait que nous avons obtenu le même résultat chez les cobayes injectés avec le mélange de culture et de sérum normal.

Pour terminer ce chapitre rappelons une expérience de Bull et Pritchett (1).

Ces auteurs injectent dans la veine d'un pigeon le mélange de 1 cent. cube de toxine de *B. perfringens* et de 1 cent. cube de sérum de lapin normal. Le pigeon meurt en une heure et demie.

Cette observation, d'apparence contradictoire, ne fait en réalité que confirmer nos conclusions. En effet l'hémolysine du *B. perfringens* dissout très activement les globules rouges de pigeon; son indice atteint quelquefois jusqu'au chiffre 200. Et, cependant, le sérum de lapin neuf n'exerce aucun pouvoir empêchant vis-à-vis de cette hémolysine. Il ne pouvait donc pas empêcher la mort de l'animal dans l'expérience des auteurs américains que nous venons de citer.

Hémolysine du Vibron septique.

Le Vibron septique sécrète *in vivo* une hémolysine très active, comme le montrent les lésions hémorragiques considérables qu'on trouve à l'autopsie d'animaux morts à la suite d'inoculation intramusculaire ou sous-cutanée de culture de cet anaérobie.

In vitro, le Vibron septique sécrète aussi une hémolysine, mais la partie non hémolytique de sa toxine est assez active

(1) *Journ. of exp. med.*, 1917, 26, p. 416.

pour causer la mort de l'animal, même lorsqu'elle est débarrassée de tout pouvoir globulicide. Ainsi, dans une de nos expériences, la toxine du *Vibron* septique, filtrée sur bougie Chamberland, tuait régulièrement, à la dose de 1 cent. cube, un lapin de 2 kilogrammes. Débarrassée de son hémolysine par contact avec les globules rouges de lapin, la même toxine ne tuait plus un lapin de même poids qu'au bout de vingt-quatre heures, et encore à la dose double (2 cent. cubes).

D'autres fois, la toxine non hémolytique du *Vibron* septique est tellement active que son action n'est nullement affaiblie ni retardée par la suppression de l'hémolysine.

Hémolysine du staphylocoque doré.

Sans jouer un rôle prépondérant, l'hémolysine du staphylocoque doré contribue pour une grande part à l'intoxication générale de l'organisme causée par ce microbe. Aussi occupe-t-elle une place intermédiaire entre les hémolysines précédentes, comme cela découle d'ailleurs de quelques expériences que nous allons résumer.

Dans la première expérience, la toxine centrifugée du staphylocoque (24 cent. cubes) n'a été que partiellement débarrassée de son hémolysine, par contact de quinze minutes à la température du laboratoire avec le culot globulaire de sang de lapin (2 cent. cubes).

Son indice hémolytique était 100 avant le contact; après, il s'élevait encore à 40. Aussi les 2 lapins injectés avec la toxine traitée sont-ils morts en même temps (deux minutes et quelques heures) que les lapins témoins.

Dans une deuxième expérience, où la toxine du staphylocoque a été complètement privée de son hémolysine au contact d'une quantité plus grande de globules rouges (culot globulaire de 25 cent. cubes de sang pour 50 cent. cubes de toxine à indice hémolytique 50), les résultats ont été bien différents. Les deux lapins de 2 kilogrammes ayant reçu dans la veine 20 cent. cubes de toxine privée de son hémolysine sont morts au bout de vingt heures, sans avoir montré, après l'injection, de symptômes tant soit peu marqués, alors que le lapin témoin, injecté avec la même quantité de toxine centrifugée mais non traitée,

a été pris quinze minutes après l'injection de paralysie du train postérieur, suivie de mort en quelques heures.

On obtient des résultats beaucoup plus nets lorsqu'on neutralise l'hémolysine du staphylocoque par l'antihémolysine du sérum normal ou bien du sérum non spécifique.

Voici quelques expériences démonstratives :

PREMIÈRE EXPÉRIENCE SUR COBAYES. — L'indice hémolytique de la toxine centrifugée du staphylocoque vis-à-vis des globules rouges de cobaye est 20. L'indice anti-hémolytique des sérums employés : 20 pour le sérum normal, 500 pour le sérum 803 (sérum antivibron septique, à la fois antitoxique et antimicrobien).

Cobayes	Reçoivent dans la veine				Meurent
350 gr.	2 c.c.	de toxine centrifugée			en 15 minutes.
400	2	—			dans la nuit.
400	2	—			dans la nuit.
300 gr.	2 c.c.	de toxine,	1 c.c.	de sérum normal	en 4 jours.
300	2	—	1	— 803	en 6 — 1/2
300	2	—	0,5	— —	en 2 —

DEUXIÈME EXPÉRIENCE SUR COBAYES. — Toxine staphylococcique et mêmes sérums que dans l'expérience précédente.

Cobayes	Reçoivent dans la veine				Meurent
250 gr.	2 c.c.	de toxine centrifugée			en 6 heures.
320	2	—			en 24 heures.
300	2 c.c.	de toxine,	1 c.c.	de sérum normal	en 4 jours.
270	2	—	0,5	—	en 36 heures.
280	2	—	0,2	—	en 2 heures.
300	2	—	0,5 c.c.	de sérum 803	en 48 heures.
270	2	—	0,2	—	en 36 heures.
280	2	—	0,1	—	en 3 jours.

EXPÉRIENCE SUR LAPINS. — L'indice hémolytique de la toxine staphylococcique est 90; les sérums sont les mêmes que dans l'expérience précédente.

Lapins	Reçoivent dans la veine				Meurent
1.800 gr.	5 c.c.	de toxine centrifugée			dans la nuit.
2.320	10	—			en 5 minutes.
2.100	10	—			en 7 minutes.
2.200	10	—			en 45 minutes.
2.250	10	—			en 21 h. 50.
2.300	10 c.c.	toxine centrif.	0 c.c.	5 de sérum 803	en 22 heures.
2.500	10	—	1 c.c.	—	en 9 jours.
2.200	10	—	2 c.c.	—	en 13 jours.

Les résultats obtenus dans ces expériences sont d'autant plus significatifs que la toxine centrifugée de staphylocoque renferme encore un nombre considérable de germes et que, d'autre part, l'hémoculture faite à l'autopsie des animaux morts avec un grand retard à la suite d'injection intraveineuse de mélange de toxine-sérum a toujours donné des résultats positifs (1).

*
*
*

Les faits que nous venons d'exposer démontrent nettement que les hémolysines bactériennes, loin d'être inoffensives, contribuent à l'intoxication générale de l'organisme au cours de l'infection microbienne. La part qui revient à chaque hémolysine dans cette intoxication dépend non seulement de l'intensité de son pouvoir globulicide, mais aussi de la proportion dans laquelle elle se trouve mélangée à la partie non hémolytique, dans une dose mortelle de toxine totale.

Cette proportion est très variable non seulement pour les différentes espèces microbiennes, mais encore pour les différentes souches d'une même espèce. Elle n'est même pas constante pour une souche donnée.

Ainsi une souche du *B. perfringens* très hémolytique peut, exceptionnellement, ne pas former d'hémolysine et produire chez le cobaye un œdème blanc. D'autre part, nous avons des souches de *B. perfringens* ayant causé chez l'homme une gangrène gazeuse toxique à œdème blanc et qui, une fois isolées de l'homme, se sont montrées très hémolytiques aussi bien *in vivo* que *in vitro*.

Du fait qu'une hémolysine joue un rôle prédominant dans l'intoxication générale de l'organisme causée par une toxine microbienne, il ne faudrait pas conclure que la partie non hémolytique de cette toxine soit complètement inactive. Ainsi la toxine du *B. perfringens*, débarrassée de son hémolysine, ne tue plus les cobayes du même poids que le témoin (400 grammes), mais

(1) Le staphylocoque passe à travers la bougie Chamberland L2. Nous avons trouvé jusqu'à 150, 160 germes pour 1 cent. cube d'une toxine obtenue par la filtration d'une culture de staphylocoque préalablement centrifugée pendant dix minutes. Cela explique pourquoi l'hémoculture pratiquée à l'autopsie des lapins injectés avec la toxine filtrée a donné, dans deux autres de nos expériences, des résultats positifs.

elle reste encore assez active pour tuer un cobaye de 200 à 250 grammes.

Les résultats de nos expériences avec la toxine du *Vibrio* septique ne signifient nullement que l'hémolysine ne joue aucun rôle dans l'intoxication causée par ce microbe. Ils prouvent seulement que, dans les conditions spéciales où nous nous sommes placés — et qui correspondent à la septicémie et à l'intoxication suraiguë dans les cas d'infection naturelle — la partie non hémolytique de la toxine est assez active pour amener à elle seule la mort foudroyante de l'animal.

Il ne faut pas perdre de vue la rapidité extrême avec laquelle l'hémolysine se fixe sur les globules rouges; elle explique pourquoi il est si urgent de recourir à une injection intraveineuse de sérum dans le cas d'une infection causée par un microbe hémolytique. Elle explique aussi pourquoi un sérum thérapeutique préparé contre une espèce microbienne hémolytique, comme *B. perfringens*, staphylocoque, streptocoque, pneumocoque, etc., doit posséder à un haut degré un pouvoir antihémolytique.

Cette dernière nécessité est encore soulignée par les expériences dans lesquelles nous avons réussi à neutraliser la toxine de différentes espèces microbiennes par le sérum normal de cheval et par ce fait, enfin, que ce pouvoir neutralisant du sérum normal est assez exactement proportionnel à son pouvoir antihémolytique.

L'étude du pouvoir antihémolytique du sérum de cheval vis-à-vis d'une hémolysine donnée d'origine bactérienne permet d'expliquer certains succès thérapeutiques obtenus avec le sérum normal. Comme ce pouvoir antihémolytique est très variable suivant les échantillons de sérum, on s'explique comment, en utilisant un mélange de plusieurs sérums, on augmente les chances de ces succès thérapeutiques. Ainsi, pour notre part, nous n'avons jamais observé d'infections secondaires à staphylocoques dans les plaies traitées par le sérum mixte antigangreneux, dans lequel il n'entre pas, cependant, de sérum antistaphylococcique.

L'étude du pouvoir antihémolytique du sérum normal de cheval donne également la clef de la fréquence des affections à streptocoques observées dans les mêmes conditions. Besredka

avait déjà signalé le pouvoir antihémolytique très faible du sérum normal de cheval vis-à-vis de la streptococolysine; nous l'avons trouvé, pour notre part, nul chez 150 chevaux neufs. D'autre part, de tous les sérums préparés à l'Institut Pasteur, seuls les sérums antigangreneux, antipneumococcique et antiméningococcique se sont montrés très légèrement antihémolytiques. Sur 17 échantillons de sérum antistreptococcique étudiés, 6 (sérums 732, 734, 735, 736; 771 et 788) se sont montrés nettement antihémolytiques (indice antihémolytique 200 à 500); les autres ont été complètement dépourvus de tout pouvoir antihémolytique. Il est possible que ces variations de pouvoir antihémolytique, suivant les échantillons étudiés, expliquent les résultats contradictoires signalés dans le traitement sérothérapique des infections à streptocoques. Le succès obtenu dernièrement dans trois cas de septicémie puerpérale traitée, d'après nos conseils, par du sérum antigangreneux additionné de sérum antistreptococcique choisi parmi les échantillons les plus fortement antihémolytiques, vient à l'appui de notre façon de voir.

SUR LE DOSAGE

DU TRYPTOPHANE DANS LES MATIÈRES PROTÉIQUES

par PIERRE THIOMAS.

Le tryptophane ou acide indol-3-aminopropionique fait partie de la molécule d'un grand nombre de substances protéiques, auxquelles il communique un caractère particulier, à savoir la propriété de fournir de l'indol sous l'action des bactéries de la putréfaction. La fibrine, la caséine, les albumines de l'œuf, du sérum et du lait, en particulier, se distinguent par leur teneur relativement élevée en tryptophane.

Dans la digestion des albuminoïdes, une partie du tryptophane est utilisée par l'organisme, le reste fournissant vraisemblablement la majeure partie de l'indol qui est ensuite excrété. Bien qu'il n'y ait pas de rapport défini entre la quantité d'indol formé dans l'organisme et la teneur en tryptophane des aliments, il existe cependant une relation assez étroite entre ces quantités. Le dosage du tryptophane dans les matières azotées faisant partie du régime alimentaire est donc nécessaire si on veut comprendre les variations de la quantité d'indol éliminée, en supposant — ce qui est légitime — que l'intestin n'est jamais dépourvu des espèces microbiennes capables d'amener sa formation aux dépens du tryptophane.

En examinant les travaux publiés sur le dosage du tryptophane, on se trouve amené à classer les méthodes en plusieurs groupes. Les unes reposent sur l'isolement direct du produit, les autres sur sa transformation par les bactéries en indol que l'on peut doser, d'autres enfin sur l'obtention de diverses réactions colorées dont on apprécie l'intensité ou qui servent de

(1) Ce mémoire a été remis au Comité en mai 1914.

limites de titrage. Nous examinerons rapidement ces divers procédés.

1^o MÉTHODE PAR ISOLEMENT EN NATURE. — Elle a été employée par Hopkins et Cole (1) qui ont utilisé la digestion trypsique pour détacher le tryptophane de la molécule protéique, puis l'ont séparé par précipitation au moyen du sulfate mercurique en milieu acidifié par l'acide sulfurique. Après lavage du précipité, on le décompose au moyen de l'hydrogène sulfuré, puis on recommence encore une fois ce traitement. La solution obtenue est concentrée jusqu'à cristallisation; finalement, on sèche et on peut peser. Hopkins et Cole ont ainsi retiré directement de la caséine 1,5 p. 100 de son poids de tryptophane. Ce résultat, que les auteurs indiquent comme un minimum en raison des pertes inévitables, est à retenir.

Cette méthode est celle qui donne les résultats les plus certains; elle exige naturellement une quantité importante de matière protéique, ce qui la rend inapplicable dans beaucoup de cas.

2^o MÉTHODE PAR TRANSFORMATION EN INDOL ET DOSAGE DE CE CORPS. — On a songé à décomposer le tryptophane et à doser l'indol produit. Ainsi, W. von Moraczewski (2) provoque la putréfaction de divers albuminoïdes, après les avoir soumis à la digestion pepsique et trypsique. L'indol formé est séparé par distillation et dosé. Mais les chiffres obtenus montrent que le calcul du tryptophane, basé sur ces dosages d'indol, ne peut donner aucun résultat constant.

3^o MÉTHODE DE TITRAGE BASÉE SUR L'EMPLOI D'UNE RÉACTION COLORÉE. — Le tryptophane en solution pas trop étendue donne avec l'eau de brome une coloration rouge violacé. Cette réaction a été d'abord utilisée par Levene et Rouiller (3), en 1907, pour le dosage volumétrique, au moyen d'une solution titrée d'eau de brome. La fin du titrage était indiquée par le virage de la coloration du rouge violet au jaune, ce qui correspond à la transformation du mélange de tryptophane monobromé et dibromé en combinaison dibromée.

On peut reprocher à ce dosage son manque de précision.

(1) F. G. HOPKINS et S. COLE. *Journ. of Physiol.*, 1904, 27, p. 418.

(2) W. VON MORACZEWSKI. *Bioch. Zeitsch.*, 1913, 51, p. 340.

(3) P. LEVENE et C. ROUILLER. *Journ. of Biol. Chem.*, 1907, 2, p. 481.

D'autre part, il n'est applicable que dans des solutions ne contenant, à côté du tryptophane, aucun corps susceptible d'absorber le brome.

4^o MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES. — Fasal (1) a indiqué en 1912 un procédé basé sur l'action de l'acide sulfurique en présence de l'acide glyoxylique (réaction de Hopkins). Il se fait une coloration violette, que l'auteur compare, au colorimètre, avec une gamme colorée obtenue au moyen d'une solution titrée de tryptophane pur.

Plus récemment, Herzfeld (2) a publié une méthode qui repose sur l'emploi du *p*-diméthylaminobenzaldéhyde en présence d'acide chlorhydrique. La coloration bleue qui apparaît progressivement est comparée, au colorimètre ou au spectrophotomètre, à celle que fournit une solution titrée de tryptophane pur, comme dans la méthode de Fasal.

Ces procédés sont d'une application commode et présentent l'avantage d'exiger seulement de petites quantités de substance. Leur précision laisse toujours à désirer, mais elle est au moins de même ordre que celle des méthodes d'isolement qui permettent actuellement de doser les acides aminés.

J'ai donc repris l'étude du procédé indiqué par Fasal. Cet auteur prend 0 gr. 4 environ de substance, desséchée jusqu'à poids constant, y ajoute 2 cent. cubes de solution d'acide glyoxylique (obtenue par réduction d'une solution saturée d'acide oxalique avec l'amalgame de sodium) puis 6 cent. cubes d'acide sulfurique concentré ; après avoir mélangé, il compare au colorimètre Dubosq avec le type de la gamme colorimétrique qui paraît le plus voisin de la teinte obtenue.

Fasal, voulant contrôler sa méthode, détermine la teneur en tryptophane de la caséine ; il trouve le chiffre de 0,65 p. 100. Comme dans une préparation faite par Abderhalden et Kempe (3), ces auteurs avaient obtenu avec la caséine 0,53 p. 100 de tryptophane, Fasal considère l'accord comme satisfaisant, sa méthode colorimétrique excluant, dit-il, les pertes.

En fait, en répétant le dosage selon Fasal avec de la caséine desséchée, en poudre, j'ai obtenu le chiffre de 0,6 p. 100. Il

(1) H. FASAL. *Bioch. Zeitsch.*, 1912, **44**, p. 392.

(2) E. HERZFELD. *Bioch. Zeitsch.*, 1913, **56**, p. 258.

(3) E. ABDERHALDEN et KEMPE. *Zeitsch. physiol. Chemie*, 1907, **52**, p. 208.

semble donc qu'il y a concordance. Malheureusement, on observe qu'après quelques heures de repos le mélange coloré en violet laisse surnager des grains très fins fortement colorés. C'est qu'une partie de la caséine ne s'est pas dissoute dans l'acide, accident presque inévitable avec la plupart des substances protéiques lorsqu'elles ont été séchées à l'étuve. J'ai alors pris de la caséine du même échantillon, que j'ai finement pulvérisée au mortier d'agate, tamisée au tamis de soie fin, puis séchée jusqu'à poids constant. Une détermination faite sur cette poudre m'a donné la valeur de 1,78 p. 100, la totalité du produit passant en dissolution dans l'acide sulfurique.

Ce chiffre peut être considéré comme en parfait accord avec celui de Hopkins et Cole, qui est d'ailleurs indiqué par Abderhalden lui-même dans ses ouvrages (1). En travaillant avec la méthode de Fasal, on peut donc arriver à des résultats satisfaisants, si on prend la précaution de pulvériser la substance assez finement pour qu'elle passe entièrement en dissolution dans l'acide; cet auteur paraît avoir négligé cette précaution et par suite tous les résultats publiés par lui semblent bien douteux. Cette méthode présente pourtant un très grave inconvénient: c'est de donner des colorations très variables, allant du bleu au rouge-violet par toutes les teintes du violet. La comparaison au colorimètre avec la teinte bleue donnée par le tryptophane pur devient dès lors difficile, souvent impossible. Lorsqu'il s'agit de matières protéiques très riches en groupements hydrocarbonés, la couleur est toujours rabattue par une proportion variable de brun et la comparaison est impossible.

La méthode de Herzfeld paraît devoir éviter les inconvénients de la précédente. En effet, le tryptophane, préalablement libéré de la molécule par la digestion trypsique, est mis en évidence au moyen de réactifs moins violents, et les colorations obtenues semblent être en rapport plus direct avec sa teneur dans la molécule protéique.

Herzfeld prend 1 gramme de matière protéique séchée, qu'il dissout dans 500 cent. cubes d'une solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100, ajoute 0 gr. 5 de pancréatine et laisse digérer vingt quatre heures à l'étuve, en présence de chloro-

(1) E. ABDERHALDEN. *Lehrbuch d. physiol. Chemie*, 1914, 3^e édit., p. 400.

forme et de toluène. Après ce temps, il mesure exactement 50 cent. cubes du liquide refroidi et filtré, y ajoute 10 cent. cubes de réactif au *p*-diméthylaminobenzaldéhyde (1), puis 40 cent. cubes d'acide chlorhydrique concentré, et laisse trente heures à la température ordinaire. Le liquide bleu est alors comparé, au colorimètre ou au spectrophotomètre, avec celui qui est fourni par une solution titrée de tryptophane. Bien entendu, le tryptophane contenu dans la pancréatine est déterminé par une expérience de contrôle et il en est tenu compte dans le calcul du résultat.

Dans quatre déterminations faites avec la caséine, Herzfeld trouve 0,52; 0,53; 0,51; 0,50; moyenne : 0,515 p. 100. En opérant par sa méthode, j'ai trouvé de 1,3 à 1,4 p. 100. Quelles peuvent être les raisons de cette divergence? Il y en a plusieurs.

D'abord, ici encore, la finesse de la poudre a son importance, car la dissolution dans le carbonate de sodium étendu peut n'être pas complète. Des poudres fines de caséine m'ont donné 1,60 et 1,63 au lieu de la teneur indiquée plus haut. Avec certaines substances, la finesse de la poudre ne suffit pas toujours, et il faut avoir recours à un autre moyen, comme nous le verrons plus loin.

D'autre part, la durée de la digestion employée par Herzfeld, vingt-quatre heures, est insuffisante pour détacher la totalité du tryptophane fixé dans la molécule. Hopkins et Cole indiquent de laisser la digestion jusqu'à ce que la réaction à l'eau de brome soit maximum, ce qui peut atteindre jusqu'à sept jours. On sait d'ailleurs que la quantité libérée augmente nettement dans les premiers jours de la digestion.

Enfin, Herzfeld paraît négliger complètement l'action de la lumière sur le développement de la réaction colorée qu'il utilise. J'ai observé qu'un mélange laissé à l'obscurité se colore beaucoup plus lentement qu'un autre mélange identique placé en pleine lumière. Sur une table, dans un laboratoire, des différences d'éclairement produisent des différences d'intensité dans

(1) Ce réactif a la composition suivante :

<i>p</i> -diméthylaminobenzaldéhyde.	20 grammes.
Acide chlorhydrique concentré.	500 cent. cubes.
Eau	500 cent. cubes.

la couleur des échantillons placés côte à côte. De plus la durée de trente heures qu'il indique est plutôt insuffisante; j'ai obtenu après quarante-huit et même soixante heures des résultats plus comparables.

J'ajouterai qu'il n'y a aucun intérêt, au point de vue de la précision, à remplacer le colorimètre par le spectrophotomètre; ces deux instruments se complètent plutôt. Le colorimètre donne de très bons résultats pour comparer les teintes bleues de faible ou moyenne intensité, dans lesquelles une légère différence de coloration ne gêne pas la comparaison, et dont le pouvoir absorbant est trop petit, sous faible épaisseur, pour permettre utilement l'emploi du spectrophotomètre. Inversement, ce dernier instrument convient très bien pour comparer des solutions intensément colorées, avec lesquelles l'emploi du colorimètre n'est pas recommandable (1).

* .

J'ai, en tenant compte de ces faits, employé le mode opératoire suivant. La substance protéique desséchée est pulvérisée finement et tamisée à travers un tissu de soie serrée, puis la poudre est séchée à l'étuve jusqu'à poids constant. On pèse exactement un poids voisin de 0 gr. 40 de produit et on le dissout en broyant au mortier, par petites portions, dans une solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100. On complète ensuite à 200 cent. cubes avec cette solution. Certaines substances ne se dissolvent pas complètement dans ces conditions. On prend alors une certaine quantité de préparation, à l'état humide, soit coagulée par la chaleur, soit précipitée et lavée, et on l'essore avec soin. On prélève deux portions de même poids, d'environ 2 grammes, de la masse humide, et on dessèche l'une à l'étuve jusqu'à poids constant, tandis que l'autre est dissoute dans 200 cent. cubes de la solution de carbonate de sodium. On connaît ainsi le poids de matière sèche en solution.

La solution, additionnée de 0 gr. 10 d'une préparation active de pancréatine, puis de 5 cent. cubes de chloroforme et de 5 cent. cubes de toluène, est placée à l'étuve à 37° et aban-

(1) J'ai employé dans ces recherches le spectrophotomètre de Ch. Féry, construit par Beaudoin, 31, rue Lhomond, à Paris.

donnée à cette température. On prélève après chaque période de vingt-quatre heures un volume déterminé de liquide, que l'on essaie à l'eau de brome après neutralisation. Quand la coloration ne paraît plus augmenter d'intensité (cinq à sept jours), on prélève avec une pipette une certaine quantité de liquide que l'on filtre, et on mesure 50 cent. cubes de filtrat, auquel on ajoute 10 cent. cubes de réactif au *p*-diméthylamino-benzaldéhyde, préparé comme plus haut, puis assez d'acide chlorhydrique concentré et pur pour amener le volume à 100 cent. cubes. On mélange et on laisse à la lumière, en disposant à côté, soumis au même éclaircissement, un ballon semblable, dans lequel on a mis, avec le réactif et l'acide chlorhydrique, 50 cent. cubes d'une solution de tryptophane pur (1) de richesse connue (0,004 à 0,010 p. 100). Après quarante à quarante-huit heures, on compare les teintes au colorimètre; on fait de nouveau cette comparaison après cinquante-deux à soixante heures, et on calcule la richesse en tryptophane. Voici un exemple de détermination :

On a digéré un poids de caséine correspondant à 0 gr. 45 de produit sec, dissous dans 200 cent. cubes de solution, avec 0 gr. 40 de trypsine. La réaction est faite sur 50 cent. cubes de liquide, amenés à 100 cent. cubes. Une épaisseur de 0,95 de ce liquide correspond au colorimètre à une épaisseur de 1,0 du liquide obtenu avec 10 cent. cubes de solution de tryptophane à 0,02 p. 100, amenés à 100 cent. cubes.

La solution de tryptophane contient :

$$\frac{0,02 \times 10}{100} = 0,002 \text{ p. 100 de T.}$$

La solution de caséine contient :

$$\frac{0,002 \times 1}{0,95} = 0,0021 \text{ p. 100 de T.}$$

La totalité de la digestion de caséine contient :

$$\frac{0,0021 \times 200}{50} = 0,0084 \text{ p. 100 de T.}$$

(1) Le tryptophane qui a servi à ces comparaisons provenait de la maison Hoffmann La Roche, 21, place des Vosges, à Paris.

Il est commode d'en préparer une solution à 0 gr. 20 p. 100, que l'on dilue plus ou moins au moment de l'expérience.

La trypsine employée contenait, d'après la détermination préalable, 0,70 p. 100 de tryptophane, soit 0,0007 pour 0 gr. 10, quantité utilisée. Il reste donc $0,0084 - 0,0007 = 0,0077$ T pour 0 gr. 45 de caséine, ce qui fait :

$$\frac{0,0077 \times 100}{0,45} = 1,71 \text{ p. 100 de caséine.}$$

CONCLUSIONS

Le dosage de tryptophane est une opération simple et conduit à des résultats concordants si on suit exactement le mode opératoire indiqué. Pour les substances qui résistent à la digestion ou refusent de se dissoudre complètement, on pourra se trouver bien du procédé de Fasal, mais à condition de partir d'un produit très finement pulvérisé et si ce produit ne renferme pas une proportion trop élevée de restes hydrocarbonés.

Quant à la teneur de la caséine en tryptophane, variable entre 1,7 et 1,8 p. 100 d'après les deux méthodes, elle concorde suffisamment avec les résultats de Hopkins et Cole pour pouvoir être admise.

ÉTUDES SUR LA PRÉCIPITATION MUTUELLE DES ANTICORPS ET DES ANTIGÈNES

(TROISIÈME MÉMOIRE)

SÉRUMS ANTICELLULAIRES — VALEUR PRATIQUE DE LA RÉACTION PRÉCIPITANTE

par M. NICOLLE et E. CÉSARI.

Sérums anticellulaires.

Les sérums, obtenus en immunisant les chevaux ou les lapins contre les bactéries (ou, mieux, les cellules) les plus diverses, précipitent constamment les extraits correspondants. Ces extraits peuvent être préparés de plusieurs façons : macération en eau physiologique de germes tués par l'alcool-éther (et desséchés), suivie de filtration—dissolution, dans l'eau distillée, de filtrats microbiens précipités par le sulfate de soude anhydre—macération, en eau distillée, de germes broyés avec le sulfate de soufre anhydre (et desséchés), suivie de filtration—liquide de laquage des hématies (hémolyse par l'eau distillée) isotonisé et filtré, etc... Dans tous les cas, soit par mélange, soit par superposition (avec ou sans gélatine, ajoutée au liquide « inférieur »), l'interréaction du sérum et de l'extrait se manifeste sous la forme d'un précipité nettement visible.

Citons, comme objets d'étude : les sérums antipneumococciques équins (types 1, 2, 3 et 4); les sérums antiméningococciques équins (A, B et C); le sérum antigonococcique équin; les sérums antityphique et antiparatyphiques (A et B) équins; les sérums antistreptococciques équins; les sérums anti-Shiga et anti-Flexner équins; le sérum antituberculeux équin de Vallée; le sérum d'un cheval traité par la levure de bière; les sérums

de lapins qui avaient reçu : des vibrions cholériques, du pneumobacille, de la bactériidie asporogène, du *micrococcus melitensis*, du staphylocoque, du bacille de la morve, de la levure de bière, des hématies (ou du sérum) de mouton, etc... Dans toutes nos expériences, les sérums normaux demeuraient, bien entendu, inefficaces.

La « communauté d'antigènes » entre des microbes (ou, mieux, des cellules) d'espèce différente, signalée par nous à maintes reprises, communauté que l'agglutination et surtout la réaction de Bordet-Gengou révèlent avec évidence, se retrouve encore ici : sérum antipneumococcique d'un type donné, précipitant l'extrait d'une autre race; sérum antipneumococcique du type 2, précipitant les extraits de nombreux streptocoques; sérums antiméningococciques et antigonococcique, précipitant chacun les extraits des trois types de méningocoques et du gonocoque; sérums anti-Shiga et anti-Flexner, précipitant l'extrait des deux espèces de germes; sérum antihématies de mouton, précipitant les extraits globulaires de mouton et de bœuf et l'extrait de viande de bœuf; sérum antisérum de mouton, jouissant des mêmes propriétés, etc...

Valeur pratique de la réaction précipitante.

Les cellules et humeurs peuvent renfermer trois sortes d'antigènes : *toxines, enzymes et constituants « indifférents »*. Ces trois sortes d'antigènes, à l'état « liquide », réagissent avec les anticorps homologues, par une précipitation mutuelle, ainsi que nous l'avons établi. Le phénomène de la précipitation comporte donc, *théoriquement*, la plus haute valeur diagnostique. *Pratiquement*, la coexistence fréquente des trois sortes d'antigènes dans les extraits cellulaires, filtrats ou humeurs et la présence simultanée des trois sortes d'anticorps dans les sérums correspondants rendra souvent les recherches qualitatives et *a fortiori* les titrages très difficiles, voire impossibles. Si l'on veut déceler soit un antigène, soit un anticorps, il faut nécessairement que le premier domine dans l'extrait, le filtrat ou l'humeur étudiés et le second dans le sérum homologue. Il est non moins indispensable que les éléments réagissants se trouvent en con-

centration suffisante, car l'effet précipitant a ses limites, que les réactions « parasites » ne permettront jamais de reculer indéfiniment.

Laissant de côté ce qui concerne les enzymes et antienzymes, dont la connaissance est encore peu avancée, nous allons examiner, d'une part, le cas des toxines et des antigènes indifférents et, d'autre part, celui des anticorps, que tous les deux peuvent engendrer chez les sujets malades ou immunisés. On envisagera donc, successivement, la recherche des antigènes (par les anticorps) et celle des anticorps (par les antigènes).

Recherche des antigènes.

TOXINES. — Comment mettre les toxines en évidence dans les filtrats et extraits microbiens? Dans les *filtrats*, il est aisé de les déceler *et de les titrer*, si l'on s'adresse à des liquides très actifs, tels les bouillons de culture diphtérique ou tétanique, débarrassés de leurs germes. Ces bouillons représentent, pratiquement, des solutions de poison pur et les sérums employés pour les étudier sont à la fois très efficaces et avant tout antitoxiques. La recherche et le titrage n'offrent alors aucune difficulté (voir notre second mémoire). Avec les *extraits*, on rencontre des obstacles insurmontables. Prenons, comme exemple, la toxine du bacille de Shiga, renfermée dans les extraits au sulfate de soude (1) et le sérum obtenu en injectant ces extraits.

Les liquides qui servent à la recherche contiennent un excès énorme de substance microbienne et les sérums utilisés un excès non moins énorme d'anticorps dirigés contre cette substance; toxine et antitoxine sont donc noyées au sein d'autres éléments réagissants, qui « gouvernent » la formation des précipités obtenus. Il faudrait opérer avec des filtrats très toxiques de cultures jeunes et les sérums engendrés par ceux-ci (voir plus loin). — Nous n'avons pas rencontré les poisons diphtérique et tétanique dans les sérums *thérapeutiques* correspondants; ils circulent, chez les animaux, quelque temps après

(1) M. NICOLLE, E. DEBAINS et G. LOISEAU. Ces *Annales*, août 1916.

chaque injection de toxine, comme on l'a observé jadis et la réaction précipitante les mettrait sans doute en évidence à ce moment.

ANTIGÈNES « INDIFFÉRENTS » (ou antigènes de constitution). — Nous avons montré, précédemment, que leur recherche dans les extraits ou filtrats microbiens peut représenter une excellente méthode d'identification des germes. Chacun connaît l'identification des humeurs par la précipitation. La recherche *et le titrage* des sérums étrangers, chez les sujets qui les ont reçus, n'offrent aucune difficulté (voir notre premier mémoire). La mise en évidence des antigènes microbiens, au cours des maladies infectieuses, dépend de la quantité circulante et, conséquemment, de l'âge et de l'intensité de l'infection. Nous avons décelé, dans le sérum de certains malades, les antigènes pneumococciques et méningococciques, mais nos études, n'ayant porté que sur peu de cas, n'offrent point de valeur statistique. Mêmes réflexions pour la recherche des antigènes microbiens chez les animaux immunisés.

Recherche des anticorps.

ANTITOXINES. — Inutile de souligner à nouveau les avantages de l'essai *in vitro*, appliqué aux sérums antidiphthérique et antitétanique. Le titrage de l'antitoxine dysentérique (dirigée contre le poison du bacille de Shiga) comporte les difficultés indiquées plus haut, quand on opère avec les extraits bacillaires et le sérum correspondant. Les résultats sont moins incohérents, si l'on substitue aux extraits les filtrats de cultures jeunes et nos expériences indiquent nettement que ces filtrats permettraient de tirer sans difficulté des sérums engendrés par eux. Malheureusement, il est bien plus ardu d'obtenir, d'une façon régulière, des produits actifs en s'adressant aux cultures liquides qu'en utilisant les extraits microbiens et ces derniers constituent la meilleure source de toxine en matière d'immunisation.

ANTICORPS DES ANTIGÈNES « INDIFFÉRENTS » (Précipitines des auteurs). — Le sérum des pneumoniques, celui des individus

atteints de fièvres typhoïde ou paratyphoïde (B) peut renfermer des précipitines, comme nous l'avons noté plusieurs fois. Il serait intéressant de comparer systématiquement, dans les maladies infectieuses, les résultats de la précipitation et ceux de l'agglutination, les deux méthodes ayant chacune leurs avantages respectifs. Rappelons que l'on peut déceler *et titrer* aisément l'anticorps spécifique, chez les sujets atteints de l'affection sérique (voir notre premier mémoire). Quant au sérum des animaux immunisés avec les cellules les plus diverses (microbes, notamment), il renferme toujours, à un moment donné, la précipitine homologue. L'activité de celle-ci mesure *exactement* la « force » du sérum. On en conclura sans doute qu'elle peut mesurer, *ipso facto*, le pouvoir bactériolytique (le pouvoir curatif, médicalement parlant). *Pas le moins du monde* et voici pourquoi :

Nous avons établi ailleurs (1) qu'au cours de l'immunisation les anticorps croissent de façon continue et que leur développement se traduit par un effet coagulant de plus en plus marqué : les sérums apparaîtront donc de plus en plus agglutinants ou précipitants *in vitro* et antitoxiques *in vivo*. Mais la puissance bactériolytique (ou faculté de permettre l'action des compléments) offre, avons-nous montré, un maximum, passé lequel elle demeure pratiquement stationnaire, puis décline. Ajoutons que ce pouvoir bactériolytique « devance » le pouvoir précipitant, c'est-à-dire qu'*actuellement* les méthodes susceptibles de déceler le second restent moins sensibles que celles qui nous font connaître le premier. Il en résulte qu'au début de l'immunisation l'absence de pouvoir précipitant ne permet pas de distinguer les bons et les mauvais sérums et que, plus tard, un sérum qui précipite peut être encore excellent, comme il peut commencer à fléchir. Dans l'état présent de la question, il convient donc de se méfier des sérums qui précipitent très énergiquement, mais cette méfiance légitime ne saurait remplacer le titrage *in vivo*.

Par conséquent, la réaction précipitante permet d'identifier et de titrer les antigènes et les anticorps, lorsque la concentra-

(1) M. NICOLLE et E. CÉSARI. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 17 avril 1920.

tion de ceux-ci atteint un degré suffisant et lorsqu'une seule sorte d'antigène et d'anticorps se trouve pratiquement en jeu. Elle fournit les moyens de doser avec exactitude le pouvoir antitoxique des sérums, mais ne saurait renseigner sur l'étendue de leur puissance bactériolytique.

SYNTHÈSES DE L'ACIDE CYANIQUE PAR OXYDATION DES SUBSTANCES ORGANIQUES

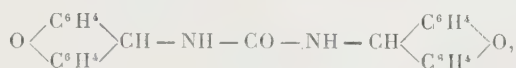
NOUVELLES MÉTHODES D'ANALYSE DE CE CORPS

par R. FOSSE.

PARTIE THÉORIQUE

CHAPITRE I

Par de nouvelles méthodes d'analyse, basées sur la précipitation de l'urée par le xanthydrol, sous forme d'un composé cristallisé spécifique, l'urée dixanthylée (1) :



nous avons acquis et démontré un ensemble de notions nouvelles, chimiques et biologiques, qui peuvent être résumées ou interprétées ainsi qu'il suit :

A. — L'urée existe à tous les degrés d'organisation de la matière vivante.

Sa présence chez les invertébrés, signalée d'abord par plusieurs auteurs, puis mise en doute ou considérée par d'autres comme vraisemblable jusqu'à un certain point (2), devient tangible si on traite par le xanthydrol le suc cellulaire des animaux inférieurs qui suivent :

Mollusques : escargot, anodonte, moule, huître ;

Insectes : ver à soie, fourmi, mouche ;

(1) Fosse (R.). *C. R. Acad. des Sciences*, 1907, **145**, p. 813. ; *Ces Annales*, 1916, **30**, p. 525.

(2) Fosse (R.). *C. R. Acad. des Sciences*, 1913, **157**, p. 151 ; *Ces Annales*, 1916, **30**, p. 673.

Crustacés : écrevisse, langouste, crevette ;

Vers : sangsue ;

Echinodermes : étoile de mer ;

Cœlentérés : actinie.

Végétaux.

L'urée découverte chez les champignons [Bamberger et Landsield, Gaze, Goris et Mascré] (1) fut, plus tard, isolée par nous dans nombre de plantes alimentaires : endive, épinard, potiron, melon, chou-fleur, navet, carotte, pomme de terre (2).

Peut-on considérer ce corps comme un produit physiologique de la cellule végétale ?

De nombreuses investigations nous ont toujours conduit à constater sa présence dans les divers milieux où vivent les végétaux : terre cultivée ou non, terreau de feuilles et de bois, prélevé dans les forêts.

Il n'est donc pas possible de savoir, après ces expériences, si la carbamide, incluse dans les champignons et les végétaux précités, est créée par eux ou puisée dans le sol.

Est-elle d'origine végétale, animale ou même minérale ?

Rien ne permettait de le savoir.

La germination de la graine des végétaux supérieurs et de la spore des moisissures nous a donné la solution de ce problème.

B. — L'urée est un produit physiologique de la cellule végétale.

Cet amide se forme à l'abri de toute contingence dans les plantes qui suivent, cultivées sur milieu absolument exempt d'urée (3) :

Plantules développées sur l'eau de la ville : blé, gazon, seigle, soleil, betterave, fève des marais, trèfle, luzerne, lentille, haricot, gesse, pois, potiron.

(1) BAMBERGER et LANDSIELD. *Monatshefte f. Chemie*. 1903, **24**, p. 218 et 1905, p. 1109 ; GAZE, 1905, *Archives. ph.*, **78** ; GORIS et MASCRÉ. *C. R. Acad. des Sciences*, 1908, **147**, p. 1488.

(2) FOSSE (R.) *C. R. Acad. des Sciences*, 1912, **155**, p. 851.

(3) FOSSE (R.). *C. R. Acad. des Sciences*, 1913, **156**, p. 567 et 263.

Plantule et plante adulte, cultivées aseptiquement sur milieu nutritif Mazé : maïs.

Graine à l'état de repos : blé, maïs, pois.

Moississure ensemencée spontanément sur milieu Raulin : Aspergillus niger.

Moississures cultivées aseptiquement sur milieu Raulin : Penicillium glaucum, Aspergillus niger.

Pour établir que la formation de l'urée est bien un phénomène commun aux végétaux et aux animaux, des précautions particulières nouvelles ont été prises dans l'emploi de la technique d'analyse.

La méthode que nous avons suivie jusque-là comportait la distillation au bain-marie, sous pression réduite, du suc d'expression des plantes, broyées avec de l'acide acétique.

Le danger de scinder les protéiques en urée, en vertu d'une réaction que nous avons décrite (1) (hydrolyse alcaline des albuminoïdes), était rigoureusement exclu, grâce à la nature acide du liquide soumis à la chaleur. Mais, même dans ces circonstances, d'autres principes connus ou encore inconnus n'étaient-ils pas capables d'engendrer des traces de carbamide?

Si peu vraisemblable que puisse paraître une telle hypothèse, nous avons tenu à l'écart, en retranchant du mode opératoire des précédentes expériences le chauffage, même à la température peu élevée nécessaire pour la distillation sous pression réduite des sucs végétaux.

Le xanthydrol nous a permis de précipiter l'urée directement à partir des sucs ou des macérations acétifiés, n'ayant pas subi l'action de la chaleur, non concentrés et refroidis (2), appartenant aux plantes qui suivent :

MOISSISSURES.

Aspergillus niger

|

Penicillium glaucum.

VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS ADULTES.

Carotte,
Endive,
Haricot vert,
Laitue vireuse,
Epinard,
Pourpier,

|

Pomme de terre,
Chicorée,
Petit pois,
Potiron,
Navet.

(1) FOSSE (R.). C. R. Acad. des Sciences, 1912, **154**, p. 1819.

(2) FOSSE (R.). C. R. Acad. des Sciences, 1913, **156**, p. 1938.

GRAINE A L'ÉTAT DE REPOS.

Maïs.

PLANTULES.

Maïs,	Trèfle,
Blé,	Luzerne,
Seigle,	Lentille,
Soleil de Russie,	Haricot,
Fève des marais,	Gesse,
Fève naine,	Gazon,
Féverole,	Potiron.

C. — L'urée est un produit d'excrétion des végétaux
comme des animaux.

Ce qui précède rattache par un nouveau lien les végétaux aux animaux et contribue à établir l'unité vitale des deux règnes.

Ce qui suit semble, au contraire, détruire cette harmonie et opposer, l'une à l'autre, les deux grandes classes d'êtres vivants. Rejetée comme excrément par l'animal, l'urée est, au contraire, acceptée comme aliment par le végétal. On sait, en effet, que les plantes peuvent se développer normalement lorsqu'elles ont reçu de l'azote exclusivement sous cette forme (G. Ville, 1862; Lutz, 1901; Czapeck, Mazé, P. Thomas) (1).

D'autre part, lorsque la plantule édifie ses tissus, l'urée apparaît en même temps que des matériaux de construction des protéiques, l'asparagine et d'autres acides aminés.

Faut-il en conclure que la molécule intacte de ce produit d'excrétion des animaux joue un rôle dans la synthèse de l'albumine des végétaux?

L'amide du plus simple des acides aminés peut-il faire partie intégrante des protéiques de la plante au même titre que les autres aminoacides homologues supérieurs?

En d'autres termes, l'urée est-elle directement assimilable par la plante? Assurément non.

Le rôle et l'utilité de l'uréase dans les plantes, insoupçonnés avant nos recherches, parce que l'on ignorait la formation de l'urée par leurs cellules, consiste précisément à détruire ce corps non assimilable pour le transformer en deux aliments par excellence : l'acide carbonique et l'ammoniaque.

(1) P. THOMAS. Ces *Annales*, 1919.

C'est pourquoi, comme nous l'avons constaté, le même végétal peut contenir simultanément urée et uréase, et être ainsi le siège des deux phénomènes inverses de formation et de destruction de ces corps (1).

La présence si fréquente de l'uréase chez les végétaux [Shibata, Takenchi, Kiesel, Zemplen, Falk, Li-Lu-Ling et Grandovinet, Kan Kato, Fosse] (2) démontre que l'urée est aussi impropre à la nutrition des plantes qu'à celle des animaux.

Si ce ferment venait à faire défaut pendant la germination, on verrait le végétal excréter l'urée comme l'animal, et la graine subir des pertes d'azote. Cette conséquence, qui découlerait de l'absence d'uréase, serait contraire à l'expérience.

D. — Les trois classes de matériaux carbonés des êtres vivants, protéiques, hydrates de carbone, graisses, possèdent la faculté d'engendrer l'urée par oxydation et sont par conséquent susceptibles de participer au vaste phénomène de la formation de l'urée dans la nature.

E. — Les protéiques et l'urée.

1. — *Formation de l'urée par oxydation permanganique des protéiques.*

D'après Béchamp, Ritter, Hofmeister, Hugounenq, l'oxydation de l'albumine conduit à l'urée. D'après Staedeler, Subbotin, Loew, Tappeiner, Lossen, l'urée ne se produit point dans ces conditions (3).

La littérature chimique antérieure à nos recherches n'accordait aucun crédit à l'expérience de Béchamp. La plupart des traités ne la citaient même pas. D'autres estimaient que cette formation de l'urée n'avait pas été réalisée, paraissait douteuse ou n'était pas suffisamment démontrée. La cause des résultats contradictoires, obtenus par les auteurs cités, et de l'opinion qui en était résultée dans les ouvrages, est due aux difficultés considérables que présentait l'extraction de petites quantités d'urée d'un mélange.

(1) FOSSE (R.). *C. R. Acad. des Sciences*, 1914, **158**, p. 1374.

(2) FOSSE (R.). *Ces Annales*, 1916, **30**, p. 750.

(3) FOSSE (R.). *C. R. Acad. des Sciences*, 1912, **154**, p. 1187; *Ces Annales*, 1916, **30**, p. 642 et suiv.

Le xanthydrol nous a permis d'isoler, d'analyser et d'identifier l'urée produite par l'oxydation permanganique des protéiques : ovalbumine, globuline, fibrine, caséine, gélatine, gluten.

2. — *Formation directe de l'urée par hydrolyse alcaline des albuminoïdes.*

Quoique l'urée ait ainsi pris naissance au sein d'un mélange oxydant, il n'est cependant pas permis d'en conclure que sa formation découle nécessairement d'un processus d'oxydation.

Puisque les matières protéiques sont des dérivés guanidiques de l'arginine, nous avons pensé qu'elles devaient être capables d'engendrer directement l'urée, sous l'influence des alcalis. L'expérience a vérifié cette prévision. Pour déterminer la formation de l'urée par hydrolyse des protéiques, il n'est point nécessaire, comme on l'avait toujours fait jusqu'ici, d'effectuer la série des opérations suivantes : hydrolyse de l'albumine par les acides minéraux ; séparation de l'arginine des acides aminés et des bases hexoniques ; hydrolyse de l'arginine par la baryte ; isolement de l'urée du mélange.

Ajoute-t-on de l'acide acétique et du xanthydrol à la solution alcaline d'un protéique, préalablement chauffée 20 minutes à l'ébullition (1), on voit l'urée se déposer, sous la forme de sa combinaison xanthylée.

L'albumine produit donc indiscutablement l'urée sous l'influence soit du permanganate de potasse, soit seulement de la potasse.

L'urée formée dans l'action du permanganate sur l'albumine, provient-elle uniquement de l'hydrolyse du noyau guanidique ?

Découle-t-elle à la fois de cette origine et de l'oxydation de groupements non uréogènes ?

3. — *Le processus pur et simple de l'oxydation permet de réaliser la synthèse de l'urée aux dépens des protéiques (2).*

Ce fait résulte nettement du dosage de l'urée formée par oxydation de protéiques, dont la teneur en arginine est connue.

(1) FOSSE (R.). *C. R. Acad. des Sciences*, 1912, **154**, p. 1819.

(2) FOSSE (R.). *Ces Annales*, 1916, **30**, p. 655.

La fibrine et la caséine donnent par oxydation une quantité d'urée deux fois supérieure à celle qui correspond à l'arginine, incluse dans leur molécule.

	Urée totale par oxydation p. 100	Arginine p. 100	Urée virtuelle p. 100	Urée par synthèse p. 100
Caséine . .	3 gr. 17	4,84	1 gr. 66	1 gr. 51
Fibrine . .	2 gr. 3	3,0	1 gr.	1 gr. 3

Avant d'entreprendre de nouvelles expériences sur les protéiques nous avons cherché, d'abord, si les autres matériaux carbonés de l'organisme ne seraient pas capables de produire artificiellement l'urée par oxydation.

F. — Les hydrates de carbone et l'urée.

Dans un intéressant travail (1) Hofmeister établit que l'urée prend naissance en oxydant, en présence de l'ammoniaque, un certain nombre de substances organiques non azotées. Ce savant en signale une vingtaine que l'oxydation ammoniacale ne peut transformer en urée. Parmi elles se trouvent : le *glucose*, la *glycérine*, l'*aldéhyde formique*.

Eppinger (2) constate que, par oxydation ammoniacale, la *glycérine* et l'*aldéhyde formique* ne produisent point trace d'urée, tandis que le *glucose* peut en donner une très faible quantité.

1. — Synthèse de l'urée par oxydation du glucose et de l'ammoniaque.

Le glucose, l'ammoniaque et l'urée se trouvent présents dans tous les tissus.

Entre le *glucose*, l'*ammoniaque* et l'*urée*, ces trois principes qui se produisent incessamment dans l'organisme, aucune relation n'était connue avant nos travaux.

Lorsqu'on traite 1 gramme de glucose et d'ammoniaque par 9 grammes de MnO^4K , on obtient 7 grammes d'urée pour

(1) HOFMEISTER. *Arch. für exp. Path. u Pharm.*, 1896, **37**, p. 426.

(2) EPPINGER. *Hofmeister's Beiträge*, 1903, **6**, p. 481.

100 grammes de glucose, en suivant le mode opératoire que nous avons décrit (1).

2. — *Synthèses de l'urée par oxydation des hydrates de carbone d'origine végétale ou de la formaldéhyde en présence d'ammoniaque.*

La carbamide se produit constamment encore dans l'oxydation ammoniacale du *lévulose*, du *saccharose*, de la *dextrine*, de l'*inuline*, de l'*amidon*, de la *cellulose*, ainsi que de leur générateur, l'*aldéhyde formique*.

Ces synthèses peuvent nous expliquer la présence de l'urée chez les végétaux.

L'urée, incluse dans la plantule et même dans l'embryon, résulte de l'oxydation des principes carbonés et azotés en réserve dans la graine.

La cellule de l'*Aspergillus* et du *Penicillium* réalise la même synthèse, lorsqu'elle édifie ses tissus en brûlant du sucre et de l'ammoniaque.

3. — *Synthèse de l'urée par oxydation du glucose en présence de l'ammoniaque, prise en très petites quantités ou à des dilutions biologiques.*

Un centigramme d'ammoniaque est aisément transformable en urée lorsqu'on l'oxyde en présence de glucose. L'urée se forme encore, lorsqu'on traite par $MnO \cdot K$ une solution contenant autant de glucose que le sang et un *centigramme seulement d'ammoniaque par litre* (2).

4. — *Les hydrates de carbone et les protéiques.*

L'ammoniaque n'est pas le seul principe naturel azoté, qui, en présence du glucose, produise d'importantes quantités d'urée.

L'aptitude du glucose à l'urification n'est pas moins remarquable, lorsqu'on provoque son oxydation en présence de la substance mère de l'ammoniaque dans l'organisme, l'albumine elle-même.

(1) FOSSE (R.). *C. R. Acad. des Sciences*, 1912, **154**, p. 1449.

(2) FOSSE (R.). *Ces Annales*, 1916, **30**, p. 668.

Tandis que le rendement en urée par oxydation des albuminoïdes seuls est assez faible, il s'élève brusquement, au contraire, à des valeurs considérables, si on oxyde simultanément l'albumine et le glucose.

Nous sommes ainsi dans la nécessité d'admettre qu'une importante relation insoupçonnée existe entre la glycogénèse et l'uréogénèse.

G. Les matières grasses et l'urée.

Synthèse de l'urée par oxydation de la glycérine et de l'ammoniaque.

Ce constituant des corps gras possède, comme le glucose et les hydrates de carbone, la faculté de produire l'urée, lorsqu'on l'oxyde en présence d'ammoniaque.

..

CHAPITRE II

A. Comment l'urée se forme-t-elle dans l'organisme?

On a d'abord pensé qu'elle provenait, par isomération, du cyanate d'ammonium [Dumas et Cahours (1842) (1)] comme dans la célèbre synthèse de Wœhler.

Cette hypothèse, sans appui expérimental, sombra aussitôt dans l'oubli. Elle fut proposée à nouveau (Salkowski et Hoppe-Seyler, 1877 et 1881), lorsque Schultzen et Nencki (1869) (2) eurent constaté que l'ingestion de substances aminées provoque l'excrétion des urées correspondantes. Cependant, toutes les tentatives pour caractériser l'acide cyanique dans l'économie ou pour réaliser sa formation par oxydation des substances organiques ayant échoué, la théorie cyanique fut rejetée.

Abderhalden (3) considère que la moins fondée des théories de l'uréogénèse, c'est celle qui suppose la formation de l'acide

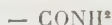
(1) DUMAS et CAHOURS. *C. R. Acad. des Sciences*, 1842, 15, p. 976.

(2) SCHULTZEN et NENCKI. *Berichte*, 1869, 2, p. 566.

(3) ABDERHALDEN. *Lehrbuch der physiol. Chemie*, 1909, p. 320.

cyanique. « Am geringsten begründet erscheint uns von diesen drei Theorien diejenige von Hoppe-Seyler und Salkowski. Es ist auch nicht gelungen, im Organismus Cyansäure aufzufinden ».

B. Hofmeister (1), n'ayant pu déceler l'acide cyanique dans le foie, fut conduit, pour expliquer la formation de l'urée, à admettre que l'oxydation ammoniacale de l'albumine, des acides aminés et d'autres substances produirait le groupement



qui, aussitôt né, disparaîtrait en s'unissant au radical résultant



de l'oxydation de l'ammoniaque.

C. D'après la doctrine universellement acceptée, l'urée aurait pour origine l'acide carbonique et l'ammoniaque. Une diastase exercerait sur leur combinaison, carbonate d'ammonium (Schmiedeberg) ou carbamate (Drechsel), avec des rendements extrêmement élevés, à 40° au maximum, et en milieu aqueux, une déshydratation, qui n'a pu être réalisée *in vitro* que de manière très limitée, en vase clos, sous des pressions considérables, à 130-140°.

Avant d'interroger la matière vivante, il nous a paru plus logique et plus simple de chercher d'abord à connaître le processus, tout à fait inconnu, que suivent les matières organiques pour se convertir en urée par oxydation artificielle.

La méthode de dosage de l'urée par le xanthidrol nous a valu la découverte de faits importants que, depuis soixante ans, bien des auteurs ont eu sous les yeux sans les voir, par suite de l'imperfection des procédés d'analyse en usage.

1. — *Un corps intermédiaire, produisant spontanément l'urée, prend naissance par oxydation des matières protéiques et des acides aminés.*

PROTÉIQUES. — Ces substances, transformées pour la première fois en urée par Béchamp, traitées par le permanganate, produisent très nettement une matière génératrice de l'urée.

Après avoir subi l'oxydation par MnO_4K , une solution de

(1) HOFMEISTER. *Arch. für exp. Path. u. Pharm.*, 1896, **37**, p. 426.

caséine contient 2 gr. 7 d'urée p. 100 de caséine. Par chauffage de la liqueur en présence de chlorure d'ammonium, le rendement s'élève à 4 gr. 23 p. 100.

Dans les mêmes conditions, on trouve :

Urée pour 100 gr. de fibrine après oxydation.	3 gr.
— — — — — et chauffage	
avec chlorure d'ammonium.	4 gr. 28

ACIDES AMINÉS. — Il est facile de montrer que la formation de l'urée par oxydation ammoniacale des acides aminés, découverte par Hofmeister (1896), est précédée et résulte d'un terme intermédiaire uréogène.

Une liqueur d'asparagine qui, après oxydation, ne renferme que des traces d'urée, en contient, après chauffage avec le chlorure d'ammonium, 10 gr. 9 p. 100 d'acide aminé oxydé.

Les produits de l'oxydation ammoniacale du glycocolle contiennent :

Avant chauffage.	0 gr. 57 d'urée 0/0
Après chauffage en présence de chlorure d'ammonium.	17 gr. 57 —

2. — *Une matière uréogène précède encore l'apparition de l'urée, lorsqu'on oxyde les autres principes carbonés des êtres vivants : la glycérine, les hydrates de carbone : glucose, lévulose, saccharose, dextrine, inuline, amidon, ainsi que leur générateur chez les végétaux : l'aldéhyde formique.*

Le rendement en urée, produit par l'action du permanganate sur la glycérine, et l'ammoniaque, voisin de zéro dans la liqueur non chauffée, s'élève à 12 gr. 57 p. 100 de glycérine, après chauffage avec NH_4Cl .

Dans l'oxydation ammoniacale du glucose on trouve :

Urée pour 100 de glucose : après l'oxydation	0 gr. 64
— — — — — et chauffage	
avec NH_4Cl	13 gr. 3

La transformation de la matière uréogène en urée ne nécessite pas forcément le concours de la chaleur ; elle a lieu même à froid, mais plus lentement. Une solution ammoniacale de

formaldéhyde, préalablement oxydée par le permanganate de calcium, produit spontanément l'urée à la température ordinaire.

Age d'une solution ammoniacale de CH^2O ,
compté à partir de la fin de l'oxydation

Urée pour 100 gr.
de CH^2O

5 heures.	5 gr. 16
1 jour	7 gr. 01
2 —	7 gr. 79
6 —	11 gr. 49
11 —	14 gr. 41
19 —	18 gr. 79
26 —	26 gr. 94
42 —	24 gr. 33

3. — *L'aptitude du glucose à produire la substance uréogène et l'urée n'est pas moins remarquable lorsqu'on provoque son oxydation en présence des protéiques.*

Tandis que le rendement en urée et substance uréogène est assez faible dans l'oxydation des albuminoïdes seuls, il s'élève, au contraire, à des valeurs considérables si, dans des conditions expérimentales convenables, on oxyde simultanément les protéiques du sang et le glucose.

Le rendement en substance uréogène et urée par oxydation du sang, additionné de glucose, s'accroît, dans certaines limites, avec la proportion de glucose et d'oxygène consommés.

Expérience	Sang	Glucose	MNO ⁵ K	Urée par litre de sérum, formée	
				avant chauffage	après chauffage
I	10 c.c.	0 gr. 8	20 gr.	4 gr.	14 gr. 7
	10 c.c.	2 gr.	30 gr.	3 gr. 4	20 gr. 1
II	10 c.c.	1 gr. 4	20 gr.	1 gr. 7	11 gr. 4
	10 c.c.	2 gr. 3	30 gr.	3 gr. 2	14 gr. 25
	10 c.c.	3 gr. 2	37 gr.	3 gr. 75	19 gr. 19

L'oxydation des protéiques du sang, additionnés de glucose, peut produire de 30 à 40 grammes d'urée par litre de sang, après transformation en urée de la matière uréogène.

Sérum	Solution de glucose	MNO ⁵ K	Urée par litre de sérum après chauffage avec NH^4Cl
1 c.c.	2 c.c. 3	4 gr.	31,42
1 c.c.	2 c.c. 1	4 gr.	37,8
1 c.c.	1 c.c. 9	4 gr.	40,4

4. — *Le corps intermédiaire qui précède et engendre l'urée est l'acide cyanique.*

La formation de ce dérivé du cyanogène par oxydation en milieu aqueux des matières carbonées, autres que l'acide cyanhydrique, est absolument nouvelle.

Toutes les tentatives pour obtenir l'acide cyanique, par oxydation des substances organiques, n'ont jusqu'ici conduit qu'à des résultats négatifs.

Gorup Besanez, cité par Drechsel (1), dit qu'en saturant par un acide la solution alcaline de leucine, oxydée par l'ozone, il a cru reconnaître l'odeur de l'acide cyanique, mais qu'il n'a pu réussir à démontrer sa présence par une réaction. Il n'existe pas de preuves, conclut Drechsel, de la formation de l'acide cyanique aux dépens des substances organiques par oxydation à l'état dissous et à la température du corps humain.

Halsey aboutit à un résultat négatif en cherchant à obtenir le même corps par oxydation du glyocolle, de l'acide oxamique et de la formiamide (2).

Dans aucune des trois séries d'expériences d'oxydation du glyocolle qu'il a instituées, Eppinger n'a pu déceler l'acide cyanique (3).

5. — *Comment nous démontrons l'existence de l'acide cyanique dans les produits d'oxydation des substances organiques :*

1° Par toutes ses réactions connues, mises en évidence à l'aide de nouveaux procédés très sensibles;

2° Par l'analyse microchimique;

3° Par le plus sûr des critères, l'analyse quantitative.

Une nouvelle méthode a été instituée permettant d'extraire à l'état de sel d'argent, pur à l'analyse, la carbimide, mêlée, même en très petites quantités, à des substances minérales ou organiques, dans un important volume de solution.

(1) DRECHSEL. *Journ. für prakt. Chemie*, 1880, 22, p. 476.

(2) HALSEY. *Zeitsch. für phys. Chemie*, 1898 25, p. 323.

(3) EPPINGER. *Beiträge zur chem. Phys. u. Path.*, 1905, 6, p. 481.

Cinq centigrammes d'acide cyanique, inclus dans pareil mélange, produisent après purification un poids de sel d'argent suffisant pour le dosage de tous les éléments et la vérification de ses réactions caractéristiques.

..

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE III

Formation d'un terme précurseur de l'urée par oxydation des principes naturels et des corps qui en dérivent ou les engendrent.

Ce corps intermédiaire, générateur de l'urée, prend naissance, lorsqu'on oxyde, en présence ou non d'ammoniaque, suivant le cas, soit les principes naturels eux-mêmes : protéiques, hydrates de carbone, glycérine, soit les substances voisines, qui en découlent ou qui leur donnent naissance : peptones, acides aminés, aldéhyde formique.

1° *Protéiques.*

A. OXYDATION DE LA CASÉINE. — *Proportion des réactifs :*

Caséine.	3 grammes.
Eau.	60 —
Permanganate de potassium	2½ —

Mode opératoire. — Au mélange d'eau et de caséine, en contact depuis vingt-quatre heures, contenu dans une fiole conique, on ajoute, en une fois, le permanganate et on place le vase, au bain d'eau, vers 85°, après l'avoir surmonté d'un tube réfrigérant.

On agite fréquemment.

Après une heure de chauffage, la totalité du persel est détruite. La mixture est aussitôt essorée et lavée avec quantité suffisante d'eau pour former un volume de 150 cent. cubes.

DOSAGE DE L'URÉE DANS LA LIQUEUR NON CHAUFFÉE.

20 c. c. de liqueur reçoivent 40 c. c. d'acide acétique et 3 c. c. de xanthidrol méthylique à 1/10. L'urée xanthylée est recueillie le lendemain.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{array}{c} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{array} \text{O})^2$	Urée pour	
	1 litre	100 gr. caséine
0 gr. 0755	0 gr. 53	2 gr. 70

DOSAGE DE L'URÉE DANS LA LIQUEUR CHAUFFÉE 1 HEURE EN PRÉSENCE DE CHLORURE D'AMMONIUM.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{array}{c} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{array} \text{O})^2$	Urée pour	
	1 litre	100 gr. caséine
0 gr. 1192	0 gr. 84	4 gr. 25

B. OXYDATION DE LA FIBRINE. — *Proportion des réactifs :*

Fibrine	1	gramme.
Potasse	1	—
Eau	20	—
Permanganate de potassium	8	—

Mode opératoire. — La solution alcaline de fibrine, additionnée du permanganate pulvérisé, est chauffée vers 90°, jusqu'à destruction complète du caméléon.

Urée pour 100 grammes de fibrine	
avant chauffage	après chauffage en présence de chlorure d'ammonium
3 grammes.	4 gr. 28

2° Acides aminés.

A. OXYDATION DU GLYCOCOLLE. — *Proportion des réactifs :*

Glycocolle	1	gr.
Eau	10	gr.
Ammoniaque à 22° Bé.	10	c. c.
Permanganate de potassium	7	gr.
Durée de l'oxydation	1 h. 45	
Température maximum	55°	
Volume du filtrat et des eaux de lavage	100	c. c.

DOSAGE DE L'URÉE DANS LA LIQUEUR NON CHAUFFÉE.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{array}{c} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{array} \text{O})^2$	Urée pour	
	100 gr. de glycocolle	
pour 10 c. c.		
0 gr. 004	0 gr. 57	

DOSAGE DE L'URÉE DANS LA LIQUEUR CHAUFFÉE, 1 HEURE VERS 95°, AVEC NH^4Cl .

Xanthylurée pour 10 c. c.	Urée pour 100 gr. de glyocolle
0 gr. 123	17 gr. 57

B. OXYDATION DE L'ASPARAGINE. — *Proportion des réactifs :*

Asparagine.	1 gr.
Eau.	10 c. c.
Ammoniaque	10 c. c.
Permanganate de potassium pulvérisé. . .	8 gr.

Durée de l'introduction du réactif oxydant : vingt-sept minutes.

Le mélange étant encore coloré, on lui ajoute de l'ammoniac (10 cent. cubes).

Température maximum : 60°.

Volume du filtrat et des eaux de lavage : 100 cent. cubes.

DOSAGE DE L'URÉE DANS LA LIQUEUR NON CHAUFFÉE ET APRÈS CHAUFFAGE
AVEC CHLORURE D'AMMONIUM.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{matrix} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^5 \end{matrix} \text{O})^2$		Urée pour	
pour 10 c. c.		100 gr. d'asparagine	
avant chauffage	après chauffage	avant chauffage	après chauffage
traces.	0 gr. 0765	traces.	10 gr 9

3° *Hydrates de carbone et ammoniac.*

A. OXYDATION DU GLUCOSE ET DE L'AMMONIAQUE. — I. *Proportion des réactifs :*

Glucose	5 gr.
Ammoniaque à 22°	30 c. c.
Eau, quantité suffisante pour	100 c. c.
Permanganate de calcium en solution aqueuse contenant 1 gramme de ce sel.	1 c. c.

Mode opératoire. — Dans la solution ammoniacale de glucose, refroidie (20 cent. cubes), on introduit, peu à peu, la liqueur de permanganate (5 cent. cubes); en évitant que la température ne s'élève au delà de 40°. Pour terminer la réduction complète du caméléon, on réchauffe le mélange à 40°.

Durée de l'expérience	1 h. 30
Volume du filtrat et des eaux de lavage. . . .	150 c. c.

DOSAGE DE L'URÉE DANS LA LIQUEUR NON CHAUFFÉE ET CHAUFFÉE 1 HEURE A 95°.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{matrix} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{matrix} \text{O})^2$ <p>pour 5 c.c.</p>		<p>Urée pour 100 gr. de glucose</p>	
avant chauffage	après chauffage	avant chauffage	après chauffage
0 gr. 0005 environ.	0 gr. 0065	0 gr. 2 environ.	2 gr. 8

II. Proportion des réactifs :

Glucose	1 gr.
Ammoniaque	20 c.c.
Permanganate de calcium cristallisé	15 gr.

A la solution refroidie par l'eau de la ville, on ajoute, en agitant avec la tige d'un thermomètre, le permanganate par portion de 1 gramme assez lentement pour que la température n'excède pas 40°, mais suffisamment vite pour qu'elle se maintienne au delà de 25°. Après huit additions successives de 1 gramme (durée de cette partie de l'expérience, trente-cinq minutes), la mixture brune reçoit encore 2 grammes, puis 5 grammes de ce sel.

L'addition de 20 cent. cubes d'ammoniaque concentrée décolore le mélange et provoque une élévation de température à 48°.

Volume du filtrat et des eaux de lavage : 150 cent. cubes.

DOSAGE DE L'URÉE DANS LA LIQUEUR CHAUFFÉE 1 HEURE A 95° ET NON CHAUFFÉE.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{matrix} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{matrix} \text{O})^2$ <p>pour 10 c.c.</p>		<p>Urée pour 100 gr. de glucose</p>	
avant chauffage	après chauffage	avant chauffage	après chauffage
0 gr. 0035	0 gr. 022	1 gr. 18	4 gr. 71

B. OXYDATION ÉLECTROLYTIQUE DU SACCHAROSE ET DE L'AMMONIAQUE.

— On électrolyse avec des électrodes de platine la liqueur suivante, refroidie au-dessous de 32°.

Sucre de canne	5 gr.
Ammoniaque à 22°	50 c.c.
Eau, quantité suffisante pour	150 c.c.

Durée de l'électrolyse : neuf heures.

Variation de l'intensité : 0 amp. 1 à 1 amp. 5.

DOSAGE DE L'URÉE DANS LA LIQUEUR ÉLECTROLYSÉE, CONSERVÉE
À LA TEMPÉRATURE ORDINAIRE, PENDANT DES INTERVALLES DE TEMPS CROISSANTS.

Age de la liqueur compté à partir de la fin de l'électrolyse	$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{array}{c} \text{C}^6\text{H}^5 \\ \text{C}^6\text{H}^5 \end{array} \text{O})_2$ pour 10 c. c.	Urée pour 100 gr. de sucre
0 heure	0 gr. 005	0 gr. 21
13 h. 30	0 gr. 0165	0 gr. 70
30 h. 30	0 gr. 0225	0 gr. 96

4° *Glycérine et ammoniacque.**Proportion des réactifs :*

Glycérine	1 gr.
Ammoniaque à 22° Bé.	50 c. c.
MnO ⁴ K	10 gr.

On ajoute le persel à la solution ammoniacale de glycérine dans l'espace de cinq minutes. Le mélange, encore fortement coloré, est décoloré par quelques gouttes de solution de glycérine à 1/20.

Volume du filtrat et des eaux de lavage : 100 cent. cubes.

DOSAGE DE L'URÉE DANS LA LIQUEUR CHAUFFÉE AVEC NH⁴Cl, OU NON CHAUFFÉE.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{array}{c} \text{C}^6\text{H}^5 \\ \text{C}^6\text{H}^5 \end{array} \text{O})_2$ pour 10 c. c.		Urée pour 100 gr. de glycérine	
avant chauffage	après chauffage	avant chauffage	après chauffage
traces.	0 gr. 088	traces.	12 gr. 57

5° *Aldéhyde formique et ammoniacque.**Proportion des réactifs :*

Polyoxyméthylène	1 gr. 1
Ammoniaque à 22°	25 c. c.
Permanganate de calcium cristallisé	15 gr.

Mode opératoire. — La solution ammoniacale de formaldéhyde, refroidie et agitée à l'aide d'un thermomètre, reçoit le persel d'abord par portion de 0 gr. 5 (quatre), puis 1 gramme (trois) et de 2 grammes (un). Le réactif oxydant est introduit

assez lentement pour que la température ne s'élève pas au-dessus de 40°.

Durée de cette partie de l'expérience : une heure trente.

Après deux heures d'abandon, on ajoute de l'ammoniaque pure pour détruire ce qui reste de caméléon.

Volume de solution : 150 cent. cubes.

DOSAGE DE L'URÉE FORMÉE PENDANT L'OXYDATION.

10 cent. cubes de liqueur reçoivent 21 cent. cubes d'acide acétique et 1 c.c. 5 de xanthidrol méthylique à 1/10. L'urée est recueillie le lendemain.

Xanthyl-urée : 0 gr. 0265, d'où urée pour 100 grammes CH^2O : 5 gr. 16

DOSAGE DE L'URÉE FORMÉE POSTÉRIEUREMENT A L'OXYDATION, A LA TEMPÉRATURE ORDINAIRE.

Si on chauffe cette solution ou si on l'abandonne longtemps à elle-même à la température ordinaire, l'urée se forme en quantité considérable.

Après 1 heure à 95°, le rendement était de 24 gr. 15 d'urée pour 100 grammes d'aldéhyde formique.

A 5 cent. cubes de solution oxydée, préalablement chauffée 1 heure, vers 95°, dans un tube à essais, muni d'un bec, surmonté d'un tube réfrigérant, on ajoute, après refroidissement, 5 cent. cubes d'eau, 21 cent. cubes d'acide acétique et 1 c. c. 5 de xanthidrol méthylique à 1/10.

Xanthyl-urée recueillie le lendemain 0 gr. 062

Urée pour 100 grammes de CH^2O : $\frac{0,062 \times 30 \times 100}{7 \times 1,1} = 24 \text{ gr. } 15$

Si on dose l'urée de jour en jour, dans la liqueur conservée à la température ordinaire, on constate l'accroissement du rendement jusqu'à une valeur maximum, voisine de celle obtenue après 1 heure de chauffage à 95°.

A 5 cent. cubes de liqueur d'oxydation, conservée 42 jours à la température ordinaire, on ajoute 5 cent. cubes d'eau, 21 cent. cubes d'acide acétique et 1 c. c. 5 de xanthidrol méthylique.

Xanthyl-urée recueillie le lendemain 0 gr. 0625

D'où urée pour 100 gr. de CH^2O : $\frac{0,0625 \times 30 \times 100}{7,7 \times 1,1} = 24 \text{ gr. } 35$

Ainsi une solution ammoniacale de formol, contenant après oxydation 5 gr. 16 d'urée pour 100 de CH^2O , mis en expérience, en renferme :

24 gr. 15 après 1 heure de chauffage à 95°

et 24 gr. 35 après 42 jours d'abandon à la température ordinaire.

FORMATION DE L'URÉE PAR LES PRODUITS D'OXYDATION DE L'ALDÉHYDE FORMIQUE ET DE L'AMMONIAQUE A LA TEMPÉRATURE ORDINAIRE.

Age de la solution compté après l'oxydation	CO (NH — CH	$\begin{matrix} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{matrix} \text{O})^2$	Urée pour 100 gr. CH^2O	
			formée spontanément	
	pour 10 c.c.	pour 5 c.c.	totale	après l'oxydation
4 heures . . .	0 gr. 0265	»	5 gr. 16	0,0

1 jour.	0 gr. 0365	»	7 gr. 01	1,85
2 jours.	0 gr. 04	»	7 gr. 79	2,63
6 —	0 gr. 059	»	11 gr. 49	6,33
11 —	0 gr. 074	»	14 gr. 41	9,25
19 —	0 gr. 0965	»	18 gr. 79	13,63
26 —	0 gr. 1075	»	20 gr. 94	15,78
42 —	»	0 gr. 0625	24 gr. 35	19,19

*
* *

CHAPITRE IV

Oxydation simultanée de deux principes naturels : protéiques et hydrates de carbone.

Lorsqu'on brûle du glucose par voie humide, en présence d'ammoniaque, celle-ci ne saurait échapper à l'obligation de former de l'urée même si cette base n'existe qu'à l'état de traces (1 centigramme) ou à la dilution de 1 centigramme par litre. De là résulte l'existence probable d'une relation insoupçonnée entre la glycogénèse et l'uréogénèse (1).

Les expériences qui suivent confirment encore cette hypothèse et montrent, en outre, la formation d'un terme intermédiaire précurseur de l'urée.

1. — *L'aptitude du glucose à produire l'urée et son terme précurseur intermédiaire n'est pas moins remarquable et intéressante lorsqu'on provoque son oxydation en présence de la substance mère de l'ammoniaque dans l'organisme : l'albumine elle-même.*

Tandis que le rendement en urée dans l'oxydation des albuminoïdes seuls est assez faible, il s'élève brusquement à des valeurs considérables, si dans des conditions expérimentales convenables, on oxyde simultanément les protéiques du sang et le glucose.

OXYDATION DES PROTÉIQUES DU SANG, ADDITIONNÉS DE GLUCOSE. —
Proportion des réactifs :

(1) FOSSE. (R.). Ces *Annales*, 1916, 30, p. 667 et 672; *Comptes rendus*, 1912, 154, p. 1448.

Sang de bœuf défibriné	10 c.c.
Permanganate de potassium pulvérisé. .	20 gr.
Solution de glucose à 1/10.	8 c.c.
Eau	20 c.c.

Mode opératoire. — Dans un vase cylindrique d'un litre contenant le permanganate, le sang et 1 cent. cube de solution de glucose, on ajoute, goutte à goutte, en agitant le glucose. Un échauffement considérable se déclare, la masse boursoufflée de bulles se soulève. De l'eau est introduite pour fluidifier la mixture et remplacer celle qui disparaît par évaporation.

Volume de liqueur : 100 cent. cubes.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{matrix} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{matrix} \text{O})_2$		Urée	
pour 10 c. c.		par litre de sang	
avant chauffage	après chauffage avec NH^4Cl	avant chauffage	après chauffage
0 gr. 028	0 gr. 103	4 gr.	14 gr. 7

2. — *Influence de la quantité de glucose et d'oxygène consommée sur le rendement en substance uréogène et urée. Le rendement s'accroît, dans certaines limites, avec la proportion de glucose et d'oxygène détruits.*

EXPÉRIENCE A.

Volume de sang	Glucose	MnO^4K	Urée, par litre de sang, formée		
			Avant chauffage	après chauffage avec NH^4Cl	pendant le chauffage
1. . 10 c. c.	0 gr. 8	20 gr.	4 gr.	14 gr. 7	10 gr. 7
2. . 10 c. c.	2 gr.	30 gr.	3 gr. 42	20 gr. 1	16 gr. 68

Même mode opératoire que ci-dessus :

Volume du filtrat et des eaux de lavage		$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{matrix} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{matrix} \text{O})_2$	
		Avant chauffage	Après chauffage avec NH^4Cl
1. . . 100 c. c.		0 gr. 028	0 gr. 103
2. . . 150 c. c.		0 gr. 016	0 gr. 094

EXPÉRIENCES B. — Trois séries d'expériences ont été instituées sur le même sérum de bœuf, chargé de globules, additionné de doses croissantes de glucose et de permanganate.

Mode opératoire. — Dans un vase de un litre contenant le

sérum, le permanganate pulvérisé, et assez d'eau (50 cent. cubes environ) pour rendre le mélange fluide, on laisse écouler goutte à goutte (quinze à vingt minutes), en agitant, une solution de glucose à 1/10 jusqu'à destruction complète du persel. On constate une élévation considérable de température.

ANALYSE DU SÉRUM, MÉLÉ DE GLOBULES, SOUMIS A L'OXYDATION

Azote par litre Kjeldahl	31 gr. 78
Urée par litre (dosée au xanthidrol). .	0 gr. 307
Azote de l'urée par litre.	0 gr. 143

Sérum vol.	Glucose	MnO ⁺ K	Urée par litre de sérum formée			N urée p. 100 N total
			apr. chauff.	av. chauff.	pend. chauff.	
1. 10 c.c.	1 gr. 4	20 gr.	11 gr. 14	1 gr. 71	9 gr. 43	16 gr. 3
2. 10 c.c.	2 gr. 3	30 gr.	14 gr. 25	3 gr. 12	11 gr. 13	20 gr. 9
3. 10 c.c.	3 gr. 2	37 gr.	19 gr. 49	3 gr. 75	15 gr. 44	28 gr. 2

Filtrat et eaux de lavage	Volume de liqueur dosée	CO(NH—CH $\begin{matrix} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{matrix} \text{O})_2$	
		après chauffage	avant chauffage
1. 450 c.c.	10 c.c.	0 gr. 052	0 gr. 008
2. 450 c.c.	40 c.c.	0 gr. 0665	0 gr. 0146
3. 250 c.c.	20 c.c.	0 gr. 1075	0 gr. 021

3. — *La quantité d'urée peut atteindre des chiffres bien plus élevés, 40 grammes par litre de sang, et dépasser singulièrement ainsi le titre des urines humaines les plus riches en urée, si l'on opère ainsi qu'il suit :*

Proportion des réactifs :

Sang de l'expérience précédente, dilué à 1/5.	5 c.c.
MnO ⁺ K pulvérisé	4 gr.
Solution de glucose D. 1.090	1 c.c. 9

Mode opératoire. — Dans un vase conique de 150 cent. cubes environ, contenant le sang et le MnO⁺K, mêlés et préalablement portés, durant quelques minutes, dans un bain d'eau à 80°, on introduit, hors du bain, goutte à goutte et en agitant, la solution de glucose. Après destruction complète de persel, addition d'eau, de chlorure d'ammonium et chauffage à 95° pendant une heure, on traite le résidu presque sec par de l'acide acétique à 66 p. 100, on essore et on lave avec le même réactif,

de manière à obtenir environ 50 cent. cubes de liqueur à laquelle on ajoute en deux fois 4 cent. cubes de xanthydrol méthylique à 1/10.



d'où urée pour 1 litre de sang : 40 gr. 4.

CHAPITRE V

Nouvelles méthodes d'analyse qualitative de l'acide cyanique.

Les méthodes de recherche de l'acide cyanique, employées jusqu'ici, doivent être bien plus imparfaites et infidèles que celles qui servaient à déceler l'urée avant l'emploi du xanthydrol.

Nul n'avait pu, en effet, avant nous, reconnaître l'acide cyanique dans les produits d'oxydation des substances organiques, autres que l'acide cyanhydrique; tandis que la formation de l'urée par oxydation des protéiques, quoique niée, il est vrai, par nombre d'auteurs, avait cependant été affirmée par d'autres. L'absence de méthode de recherche précise a caché à de nombreux savants l'acide cyanique qu'ils avaient sous les yeux.

Plusieurs, même, ont été jusqu'à affirmer la non-formation de ce corps dans une réaction qui en produit, cependant, des quantités considérables : l'oxydation ammoniacale du glyco-colle.

1. — *Moyen de caractériser l'acide cyanique par la formation de l'urée.*

La réaction de Wœhler peut servir à reconnaître de très petites quantités d'acide cyanique, puisque nous pouvons, grâce au xanthydrol, caractériser et identifier des traces d'urée.

Mais il existe plus d'un corps, susceptible d'engendrer l'urée.

Toute formation d'urée ne dérive point nécessairement de l'acide cyanique.

Cependant, la nature des conditions expérimentales qui autorisent ou empêchent l'apparition de la carbamide permet de caractériser la substance uréogène.

La grande sensibilité de notre méthode de dosage de l'urée, appliquée à l'analyse d'une ou de plusieurs substances, avant et après chauffage avec NH_4Cl (avant et après traitement par un acide), permet d'apprécier la formation de très petites quantités d'urée et par conséquent de reconnaître la condition absolument nécessaire de la présence de l'acide cyanique, même à l'état de traces.

On peut rechercher la carbimide dans un mélange soit directement en solution, soit dans le précipité brut obtenu par l'action du nitrate d'argent.

RECHERCHE DE L'ACIDE CYANIQUE DANS UNE SOLUTION.

Deux dosages d'urée sont nécessaires :

a) Le premier est effectué sur la liqueur n'ayant subi aucun traitement ;

b) Le deuxième sur la liqueur, préalablement chauffée, une heure avec du chlorure d'ammonium.

A 2 cent. cubes, par exemple, de chacune des deux liqueurs, on ajoute 4 cent. cubes d'acide acétique et 0 c. c. 3 de xanthyl-drol méthylique à 1/10.

Si le poids de xanthyl-urée de *b*) est supérieur à celui de *a*), la liqueur peut contenir de l'acide cyanique.

RECHERCHE DE L'ACIDE CYANIQUE PAR LA FORMATION DE L'URÉE AUX DÉPENS DE SON SEL D'ARGENT.

La méthode est basée sur les deux réactions :

Formation de l'urée par chauffage du sel d'argent avec du chlorure d'ammonium ;

Abolition de cette propriété par chauffage préalable du sel argentique avec l'acide azotique.

Pour apprécier la sensibilité de ces réactions, nous décrirons les expériences suivantes :

**MOYEN DE CARACTÉRISER L'URÉE PRODUITE
PAR UNE TRÈS PETITE QUANTITÉ DE SEL D'ARGENT.**

EXPÉRIENCE I. — On chauffe, 15 minutes, au bain-marie bouillant, dans un petit tube à essais, pouvant être soumis à la centrifugation :

Cyanate d'argent	0 gr. 002
Chlorure d'ammonium	0 gr. 01
Eau	0 gr. 25

La liqueur centrifugée après addition d'acide acétique (0 c.c. 5), pourvue d'un peu de xanthidrol, se transforme en une bouillie cristalline de xanthylurée.

EXPÉRIENCE II. — On évapore à sec, au bain-marie, dans une capsule de porcelaine, avec un peu de chlorure d'ammonium :

Solution de cyanate d'argent à 0 gr. 02 pour 100 c.c.	
d'eau ammoniacale	5 c.c.
D'où cyanate d'argent, mis en expérience	0 gr. 001

Le résidu sec est broyé avec :

Eau	0 c.c. 33
Acide acétique	0 c.c. 66

La mixture, placée dans un petit tube, est centrifugée.

On ajoute à la liqueur limpide, sans la décanner, 0 c.c. 05 de xanthidrol méthylique et on mélange avec un agitateur filiforme en évitant d'atteindre le léger dépôt de chlorure d'argent. L'urée xanthylée ne tarde pas à apparaître.

**ACTION SUCCESSIVE DE L'ACIDE AZOTIQUE, DE L'AMMONIAQUE,
ET DU CHLORURE D'AMMONIUM SUR LE CYANATE D'ARGENT.**

Les mêmes expériences 1 et 2, exécutées après acidulation préalable par NO^2H , chauffage, alcalinisation par NH^3 , addition de chlorure d'ammonium, puis évaporation à sec, ne donnent point la moindre trace d'urée. Même résultat négatif en opérant sur des doses plus considérables de cyanate d'argent.

Un tube à essais reçoit du cyanate d'argent (0 gr. 035), IV à V gouttes de NO^2H et un peu d'eau. Après chauffage, quelques secondes, à l'ébullition on alcalinise NH^3 , on ajoute NH^4Cl et maintient quinze à vingt minutes au bain-marie bouillant. Le liquide centrifugé reste limpide après addition de xanthidrol acétique.

Application de la réaction productrice d'urée pour caractériser de l'acide cyanique dans les produits d'oxydation des substances organiques.

Nous avons déjà décrit de nombreux exemples de formation de l'urée par simple chauffage, avec ou sans NH^4Cl , suivant le

cas de solutions de principes naturels, ayant subi l'oxydation. Il est facile de démontrer que l'urée se forme également lorsqu'on chauffe avec NH^4Cl le précipité qu'elles produisent avec NO^3Ag .

Formation de l'urée par chauffage, avec NH^4Cl , du précipité produit par le nitrate d'argent dans les solutions de substances organiques ayant subi l'oxydation.

GLUCOSE ET AMMONIAQUE. — *Oxydation.* — A 10 cent. cubes de solution aqueuse de glucose pur à 1/10, 5 cent. cubes d'ammoniaque et 5 cent. cubes d'eau, on ajoute par petites portions (7 ou 8), en agitant à l'aide d'un thermomètre, 8 grammes de permanganate de calcium cristallisé.

Durée d'introduction du réactif : une heure trente.

Variation de la température du mélange réactionnel : 20-40°.

Si la mixture possède encore une teinte rose le lendemain, on la fait disparaître, à l'aide de sulfate ferreux. On essore, on complète à 100 cent. cubes le volume du filtrat et des eaux de lavage.

Précipitation par le nitrate d'argent. — Après addition de 2 grammes de nitrate d'argent, on verse de l'acide nitrique dilué jusqu'à ce que le précipité blanc floconneux produit ne paraisse plus sensiblement augmenter.

Formation de l'urée aux dépens du précipité argentique. — Celui-ci, essoré à la trompe sur filtre concave, est soigneusement lavé pour chasser la plus petite trace d'urée, contenue dans la liqueur. La dissolution dans l'ammoniaque de l'enduit brun, retenu par le filtre, portée à l'ébullition avec du chlorure d'ammonium, est évaporée à sec au bain-marie. L'addition de quelques gouttes de xanthidrol acétique au filtrat, provenant de l'épuisement du résidu par un peu d'acide acétique, produit bientôt un précipité blanc cristallin de xanthyl-urée.

L'identification rigoureuse de l'uréine s'obtient sans peine, à l'examen microscopique des flocons, qui se déposent par refroidissement de sa solution dans l'alcool bouillant et par la détermination de sa fusion-décomposition, en tube étroit, dans la vapeur d'oxyde de phényle en ébullition.

ALDÉHYDE FORMIQUE ET AMMONIAQUE. — *Oxydation.**Proportion des réactifs :*

Polyoxyméthylène sec	1 gr.
Ammoniaque à 22 Bè.	25 c.c.
Permanganate de calcium cristallisé . . .	15 gr.

A la solution ammoniacale de CH_2O , refroidie par de la glace, on ajoute le réactif oxydant, par petites portions, de 1 gramme (5 reprises), puis de 2 grammes (5 reprises) et, enfin, de 5 grammes. On abandonne ensuite à la température du laboratoire, jusqu'à destruction complète du permanganate. Volume du filtrat et des eaux de lavage : 190 cent. cubes.

Précipitation du sel d'argent et formation de l'urée à ses dépens. — A 20 cent. cubes de liqueur, additionné de 0 gr. 50 de nitrate d'argent, on ajoute de l'acide acétique au $\frac{1}{5}$, jusqu'à faible réaction acide au tournesol.

Il en résulte un précipité blanc volumineux, formé de cyanate, d'acétate d'argent et d'autres sels noircissant à la lumière et à la chaleur.

Le précipité essoré, soigneusement lavé, est chauffé avec de l'eau et du chlorure d'ammonium. Après évaporation à sec, au bain-marie, dans une capsule de porcelaine, on reprend le résidu par l'acide acétique cristallisable et on centrifuge. Au contact du xanthidrol, la liqueur donne un notable précipité de xanthyl-urée.

La solution filtrée, obtenue en traitant la substance par de l'alcool, 10 minutes à l'ébullition, au reflux, abandonne par refroidissement des flocons volumineux, formés au microscope, de longs ligaments groupés, caractéristiques. Ce corps, placé en tube étroit, fermé aux deux extrémités, plongé dans la vapeur d'oxyde de phényle en ébullition, reste solide quelque temps, puis fond, en se décomposant en un liquide coloré avec dégagement gazeux.

La fusion-décomposition était complète après 12 minutes de chauffage dans ces conditions.

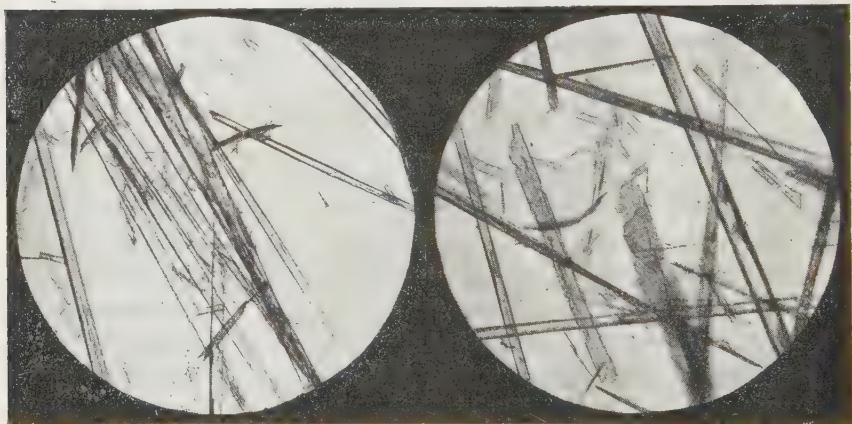
2. — Analyse microchimique de l'acide cyanique.

La cristallisation du cyanate d'argent dans l'eau pure permet, ainsi qu'on le verra plus loin, d'isoler ce corps pur d'un mélange ;

elle rend en outre possible et aisée l'analyse microchimique de l'acide cyanique. Si on épuise par un peu d'eau distillée bouillante une très petite quantité de cyanate d'argent, mêlée ou non à d'autres sels, la solution filtrée se trouble par refroidissement et abandonne des cristaux blancs brillants, qui, au microscope, apparaissent formés de longs filaments, traversant tout le champ. Suivant les circonstances de la cristallisation, ils présentent parfois des échancrures en dents de scie, parfois ils se greffent autour d'un filament commun pour imiter plus ou moins grossièrement l'aspect de la colonne vertébrale et des arêtes d'un poisson.

CRISTALLISATION DE CINQ MILLIGRAMMES DE CYANATE D'ARGENT.
ASPECT DES CRISTAUX.

On chauffe, 15 minutes environ, dans un tube à essais, surmonté d'un tube réfrigérant, 10 cent. cubes d'eau et 0 gr. 005



Photographies 1 et 2. — Cristaux de cyanate d'argent.

de cyanate. La liqueur est filtrée bouillante dans un petit cristallisateur, large, à forme basse. Après une heure d'abandon, on rejette l'eau et on examine au microscope les cristaux déposés sur la paroi. Ils sont formés de longs filaments comme le montre la photographie 1.

On obtient des filaments plus larges dont les bords sont souvent découpés en dents de scie et de formes plus irrégulières

que les précédents, en filtrant une solution saturée bouillante dans un tube à essais, placé dans l'eau chaude. Par suppression du chauffage, la liqueur se refroidit lentement et abandonne des flocons qui, examinés au microscope, offrent l'aspect de la photographie 2.

RÉACTIONS MICROCHIMIQUES DU CYANATE D'ARGENT.

La formation de l'urée par l'action du chlorure d'ammonium sur 1 milligramme de cyanate d'argent, expérience précédemment décrite, doit être considérée comme réaction microchimique de l'acide cyanique. On peut aussi reconnaître ce corps microchimiquement, par des réactions colorées, dont la plus sensible est la coloration bleue produite par le cyanate double de cobalt et de potassium :



découvert par Blomstrand (1).

L'acétate de cobalt colore les solutions de cyanate de potassium en bleu d'azur par suite de la formation du cyanate cobalti-potassique de Blomstrand, qui, stable en milieu alcoolique, se dissocie et se décolore en présence d'une certaine quantité d'eau.

E. A. Schneider a appliqué cette réaction à la recherche de l'acide cyanique dans les cyanures (2). Il a reconnu qu'elle se déclare en opérant sur 3 à 5 grammes de ce sel contenant 0,5 p. 100 de cyanate. Il en résulte donc que 15 à 25 milligrammes de cyanate de potassium ou 7 à 13 milligrammes d'acide cyanique sont nécessaires pour que la teinte bleue se déclare. Rieder, dans le laboratoire de Treadwel, a obtenu des résultats semblables, concernant cette réaction, qui, non spécifique des cyanates, appartient aussi aux sulfocyanates (3).

Sa sensibilité peut être singulièrement accrue en opérant, non plus avec des solutions de cyanates, comme on l'avait fait jusqu'ici, mais avec les cyanates eux-mêmes non dissous, ainsi que nous allons le montrer.

(1) BLOMSTRAND. *Journal für prakt. Chemie* (2), 13-206.

(2) SCHNEIDER. 1895.

(3) TREADWEL-GOSCINNY. *Analyse qualitative*, 1^{re} édition, p. 332.

ACTION DE 1 MILLIGRAMME DE CYANATE D'ARGENT, CORRESPONDANT A 0 MILLIGR. 35 D'ACIDE CYANIQUE, SUR L'ACÉTATE DE COBALT ET LE CHLORURE DE POTASSIUM NON DISSOUS.

On broye dans une petite capsule de porcelaine :

Cyanate d'argent	0 gr. 001
Acétate de cobalt	0 gr. 001
Chlorure de potassium cristallisé . . .	0 gr. 001

La coloration bleue intense, qui se déclare, disparaît par addition d'une goutte d'eau, réapparaît au contact de l'alcool.

ACTION D'UNE TRACE DE CYANATE D'ARGENT SUR L'ACÉTATE DE COBALT ET LE CHLORURE DE POTASSIUM CRISTALLISÉS.

On pèse 1 milligramme de cyanate d'argent, on en prélève une fraction aussi petite que possible, on la triture à l'aide d'un agitateur dans une minuscule capsule de porcelaine avec une aussi faible quantité de chlorure de potassium et d'acétate de cobalt, cristallisés. La coloration bleue d'azur apparaît très intense.

ACTION DU CYANATE DE POTASSIUM CRISTALLISÉ SUR L'ACÉTATE DE COBALT.

En opérant comme avec le cyanate d'argent, par trituration d'une trace des deux sels non dissous, on voit la coloration bleue se déclarer très intense.

DIFFÉRENCIATION DE L'ACTION DES CYANATES ET DES SULFOCYANATES SUR LES SELS DE COBALT.

Lorsqu'on traite la solution d'un sel de cobalt par du sulfo-cyanure d'ammonium, une coloration bleue intense se déclare, due à la formation de sulfocyanate double de cobalt. Elle disparaît par addition d'eau, réapparaît par addition d'alcool. [F. F. Morel (1); Vogel (2); Treadwel (3); Wolf (4).]

(1) MOREL. *Zeitsch. f. anal. Chemie*, **16**, 251 et TREADWEL, *Analyse qualitative*, p. 155.

(2) VOGEL. *Berichte*, **12**, 2344.

(3) TREADWEL. *Zeitsch. f. anorg. Chemie*, 1901, p. 105 et *Analyse qualitative*.

(4) WOLF. *Zeitsch. für anal. Chemie*, 18-38.

L'alcool amylique, mêlé ou non d'éther, agité avec une telle solution, décolorée par l'eau, se colore en bleu.

Les cobalto-cyanates doubles bleus, agités avec de l'alcool amylique et de l'éther, refusent, au contraire, de passer en solution dans ce solvant et de le colorer. La couche surnageante demeure absolument incolore.

Si à ce mélange on ajoute 1 goutte de solution ferrique très diluée, la coloration ne change pas sensiblement, tandis qu'elle devient rouge sang intense, quand cette addition porte sur une liqueur de sulfo-cobalto-cyanate.

Enfin, quelques gouttes d'acide chlorhydrique, ajoutées à un cobalto-cyanate bleu, détruisant l'acide cyanique, le décolorent, alors que, dans les mêmes conditions, le cobalti-sulfocyanate conserve, au contraire, sa couleur.

Application de cette réaction colorée à la caractérisation de l'acide cyanique, formé par l'oxydation de quelques substances organiques.

GLUCOSE ET AMMONIAQUE.

On oxyde ces deux corps suivant les indications précédemment données. Le sel d'argent, préparé comme il est dit plus haut, en partant de 30 cent. cubes de liqueur, est trituré dans une capsule avec du chlorure de potassium et de l'acétate de cobalt, cristallisés : coloration bleue immédiate, disparaissant par addition d'eau, réapparaissant au contact de l'alcool.

ALDÉHYDE FORMIQUE ET AMMONIAQUE.

Même mode opératoire, même résultat.

3. — *Moyen de caractériser l'acide cyanique par la formation de l'oxyurée aux dépens de son sel d'argent.*

On peut encore caractériser l'acide cyanique par une autre réaction colorée, non encore utilisée dans ce but.

L'hydroxylurée : $\text{HONH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$, découverte par Dresler et Stein (1) en faisant réagir le chlorhydrate d'hydroxylamine sur

(1) DRESLER et STEIN. *Liebigs Annalen*, 150-242.

le cyanate de potassium, se colore en bleu violet intense sous l'influence du perchlorure de fer.

Si on agite le cyanate d'argent quelques instants avec de l'eau contenant un peu de chlorhydrate d'hydroxylamine, la liqueur filtrée prend au contact du perchlorure de fer une coloration bleu-violet, qui disparaît ensuite.

La réaction devient beaucoup plus sensible et permet de reconnaître microchimiquement des traces de cyanate en opérant ainsi qu'il suit :

On broye dans une petite capsule de porcelaine à sec :

Cyanate d'argent	0 gr. 001
Chlorhydrate d'hydroxylamine	0 gr. 001

En mouillant la mixture d'une goutte de solution de perchlorure de fer très diluée (solution officinale diluée à 1/25) on voit se développer la coloration bleu-violet.

Application à la caractérisation de l'acide cyanique, formé par oxydation du glucose et de l'ammoniaque.

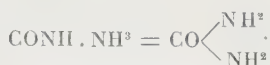
A 30 cent. cubes de liqueur, provenant de l'oxydation du glucose et de l'ammoniaque par le procédé précédemment décrit, on ajoute du nitrate d'argent et le volume d'acide azotique à 1/5 nécessaire pour neutraliser la liqueur, déterminé dans une autre expérience. On essore et lave le précipité sur filtre concave. Le filtre et son enduit sont agités dans un tube à essais avec de l'eau contenant un peu de chlorhydrate d'hydroxylamine. Le filtrat additionné de perchlorure de fer développe avec intensité la coloration bleu-violet caractéristique de l'hydroxyl-urée. Cette coloration disparaît ensuite.

4. — Identification de l'acide cyanique par l'analyse quantitative.

Nous avons établi que l'oxydation des substances organiques engendre un corps intermédiaire, produisant spontanément l'urée.

Les solutions de protéiques, seuls ou additionnés de glucose, les solutions ammoniacales d'acides aminés, de glycérine ou d'aldéhyde formique qui, après oxydation, renferment peu ou

point d'urée, en produisant avec abondance par simple chauffage, tout comme le cyanate d'ammonium dans l'expérience de Wöhler :



Quoiqu'il soit possible de précipiter de ces solutions un sel d'argent, capable de produire l'urée par chauffage avec NH_4Cl et de donner toutes les réactions connues de l'acide cyanique, nous avons cru nécessaire de démontrer indiscutablement son existence par le plus sûr des critères, l'analyse quantitative, à cause de l'importance de cette synthèse, de ses conséquences et des nombreuses expériences vainement tentées pour la réaliser.

Les conditions, indispensables pour atteindre ce but, exigent l'obtention de l'acide cyanique ou de l'un de ses dérivés rigoureusement pur.

ANALYSE IMMÉDIATE DE L'ACIDE CYANIQUE.

Le cyanate de potassium se dissout dans l'alcool à 80°, bouillant, et en cristallise par refroidissement, ce qui permet de l'obtenir pur. Mais la méthode n'est applicable qu'à de grandes quantités de substance, comme c'est le cas dans la préparation industrielle de ce corps par oxydation du cyanure de potassium.

Pour obtenir le cyanate de plomb, Williams (1) débarrasse le cyanate de potassium du commerce de son carbonate par le nitrate de baryum, puis précipite la liqueur par le nitrate de plomb.

Le sel ainsi formé est peut-être pur (?), en partant du cyanate de potassium pur, mais il ne l'est certes pas, si on le précipite d'un mélange de sels.

L'isolement, sous forme de sel de plomb pur, de l'acide cyanique n'est réalisable que si l'on peut éliminer complètement au préalable toute substance étrangère, donnant une combinaison plombique insoluble, puisque le cyanate de plomb, décomposable par l'eau chaude, ne peut être purifié par cristallisation.

(1) WILLIAMS. *Zeitsch. für Chemie*, 1863, 352. Beilstein, 4, 1265.

Ce procédé, d'application restreinte, est, en outre, assez peu sensible. Nous avons, en effet, constaté que l'azotate de plomb ne trouble pas de manière appréciable la solution de cyanate de potassium à 4/1.000. L'acétate basique de plomb précipite moins incomplètement l'acide cyanique de ses solutions.

PRÉCIPITATION DE L'ACIDE CYANIQUE A L'ÉTAT DE SEL D'ARGENT.

La précipitation de l'acide cyanique est moins imparfaite par un sel d'argent que par l'acétate basique de plomb.

Si on introduit quelques gouttes de solution de nitrate d'argent dans la liqueur filtrée, provenant de l'action de l'acétate basique de plomb, en excès, sur le cyanate de potassium, on voit, en effet, apparaître un précipité volumineux de cyanate d'argent.

PRÉPARATION DU CYANATE D'ARGENT PUR A L'ANALYSE.

L'action du nitrate d'argent sur nos liqueurs d'oxydation des substances organiques ne conduit pas à du cyanate pur.

De nombreuses expériences furent instituées, soit pour ne précipiter que l'acide cyanique d'un mélange, soit pour trouver les conditions dans lesquelles les matières étrangères ne se formeraient plus.

L'analyse du sel d'argent brut, ainsi obtenu, révéla qu'il était toujours très impur.

Matière	AgCl	Ag p. 100	
		Trouvé	Théorie
0,1271	0,1115	66,05	72,00
0,173	0,148	64,4	
0,123	0,099	60,5	
0,115	0,089	58,2	

Ces tentatives n'ayant pas donné de résultat, il ne nous resta plus qu'une ressource : isoler l'acide à l'état de pureté. Longtemps nous nous heurtâmes, pour atteindre ce but, à des difficultés considérables, dues au manque de méthode permettant d'isoler ce corps, inclus en petite quantité dans un mélange.

CRISTALLISATION DU CYANATE D'ARGENT.

Lorsqu'on place au-dessus de l'acide sulfurique, sous cloche, comme le faisait Wœhler, une solution ammoniacale de cyanate d'argent, le gaz disparaît et le cyanate cristallise en tablettes, retenant de l'ammoniaque.

En procédant ainsi, il ne nous a pas été possible d'isoler le sel pur. Même insuccès en dissolvant à chaud le produit argentique brut dans de l'eau faiblement ammoniacale.

L'emploi de l'eau pure et de la chaleur nous a donné une méthode sûre, très simple, permettant d'obtenir, à l'état de sel d'argent pur à l'analyse, de petites quantités d'acide cyanique, mêlé à des substances minérales ou organiques, dans un important volume de solution.

Mode opératoire. — La liqueur, résultant de l'oxydation, additionnée de nitrate d'argent, neutralisée *presque* complètement par de l'acide azotique dilué, abandonne un précipité floconneux, qu'on essore et lave à la trompe. Par traitement à l'eau bouillante, une partie de celui-ci se dissout, tandis que l'autre reste insoluble et brunit. Le filtrat laisse apparaître par refroidissement de petits cristaux blancs, chatoyants, caractéristiques au microscope, généralement purs après une seule cristallisation.

ANALYSE QUANTITATIVE DU CYANATE D'ARGENT.

La nouvelle méthode que nous avons instituée repose sur la détermination quantitative du chlorure d'argent et de l'urée, produits simultanément par un même poids de cyanate.

Sous l'influence de la chaleur et du chlorure d'ammonium, une molécule de cyanate d'argent donne une molécule de chlorure d'argent et une molécule d'urée :



Trois à quatre centigrammes d'acide cyanique produisent un poids suffisant de sel d'argent pour l'analyse quantitative de tous les éléments : l'argent étant déterminé à l'état de chlorure, on dose le carbone et l'azote sous forme d'urée.

EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES. — DOSAGE DE L'URÉE PRODUITE PAR CHAUFFAGE DU CYANATE D'ARGENT ET DU CHLORURE D'AMMONIUM A DIVERSES TEMPÉRATURES ET PENDANT DES TEMPS VARIABLES.

Milieu	Chauffage		Cyanate poids	Urée xanthylée Poids	Urée p. 100 de cyanate Théorie : 40 gr. Trouvé
	Durée	Température			
Eau	4 h.	80°	0,0911	0,2265	35,51
—	4 h. 30	80°	0,12795	0,308	34,4
—	4 h.	78-80°	0,1055	0,254	34,39
Ammoniaq. .	4 h.	92-94°	0,1513	0,4175	39,42
—	4 h.	92°	0,1425	0,429	40
—	4 h.	90-96°	0,1196	0,325	38,81
—	4 h.	90-92°	0,122	0,3335	39,05
—	4 h.	90-92°	0,122	0,3335	39,05

Mode opératoire pour l'analyse du cyanate d'argent. — On place au bain d'eau, réglé vers 92°, pendant 1 heure, une fiole conique à bec, lestée d'un collier de plomb, contenant 0 gr. 10 à 0 gr. 15 de cyanate d'argent et son poids de chlorure d'ammonium, dissous dans l'ammoniaque. Après 20 minutes de chauffage, on rince les parois avec un peu d'eau distillée, afin d'éviter que des traces de solution n'échappent à l'action de la chaleur. La pellicule de chlorure d'argent délayée dans l'eau acétifiée est reçue sur creuset de Gooch taré; vase et précipité sont lavés avec quantité d'eau suffisante pour obtenir un volume exactement mesuré (50 à 100 cent. cubes). L'urée est dosée sur une partie aliquote : 10 à 20 cent. cubes.

Identification de l'acide cyanique, formé par oxydation ammoniacale des substances organiques : glucose, glycérine, glyocolle, protéiques, et glucose, glyocolle.

GLUCOSE ET AMMONIAQUE.

Proportion des réactifs :

Glucose	4 gr.
Ammoniaque	10 c. c.
Eau	10 c. c.
MnO ⁴ K pulvérisé	10 gr.

On ajoute le persel au glucose ammoniacal, par petites portions. L'excès de caméléon est détruit à l'aide de 10 cent. cubes d'ammoniaque.

Volume de filtrat : 100 cent. cubes.

A 65 cent. cubes de liqueur, très légèrement acidulée par de l'acide nitrique dilué, en présence de tournesol, on ajoute 2 grammes de nitrate d'argent. Le volumineux précipité obtenu, lavé, est chauffé pendant 20 minutes avec 250 cent. cubes d'eau, à l'ébullition. Le filtrat, abandonné 12 heures dans un endroit frais, donne 0 gr. 13 environ de sel d'argent.

Analyse du cyanate d'argent. — 0 gr. 1446 de substance et 0 gr. 15 de chlorure d'ammonium, dissous dans 10 cent. cubes d'ammoniaque, sont chauffés 1 heure, vers 95°.

Volume du filtrat et des eaux de lavage : 50 cent. cubes.

Poids du chlorure d'argent : 0 gr. 1094.

Ag pour 100 grammes de matière, trouvé : 71,84 ; théorie : 72,00.

Dosage de l'urée :

Xanthyl-urée		Urée pour 100 gr. de sel d'Ag	
pour 10 c.c.	pour 20 c.c.	Trouvé	Théorie
0 gr. 0625	»	38,95	40
»	0 gr. 125	38,95	40

GLYCÉRINE ET AMMONIAQUE.

Proportion des réactifs :

Glycérine	1 gr.
Ammoniaque à 22° Bé	50 c.c.
MnO ⁴ K pulvérisé	10 gr.

Mode opératoire. — On ajoute le persel à la solution ammoniacale de glycérine dans l'espace de 5 minutes. Le mélange, encore très coloré, est rendu incolore par quelques gouttes de glycérine à 1/20.

Volume de liqueur : 100 cent. cubes.

Préparation du sel d'argent. — 80 cent. cubes de liqueur, additionnés de nitrate d'argent, reçoivent de l'acide acétique dilué, jusqu'à faible réaction acide au tournesol. Le précipité, essoré et lavé, est épuisé par 175 cent. cubes d'eau bouillante.

Poids de sel d'argent, recueilli le lendemain : 0 gr. 098.

Analyse du sel d'argent. — 0 gr. 097 de matière sont chauffés 1 heure 30 à 90°, après addition de 10 cent. cubes d'ammoniaque, et 0 gr. 10 de NH⁴Cl. Le résidu presque sec, délayé dans de l'acide acétique à 70 p. 100, essoré sur creuset de Gooch

taré, est lavé avec le même réactif de manière à produire 45 cent. cubes de liqueur, auxquels on ajoute 5 cent. cubes de solution méthylique de xanthidrol à 1/10.

Matière	AgCl	Argent		Urée	Urée p. 100 de sel d'argent	
		Trouvé	Théorie		Trouvé	Théorie
0,097	0,092	71,38	72	0,2636	39,11	40

PROTÉIQUES DU SANG ET GLUCOSE.

Proportion des réactifs :

Sérum	20 c. c.
MnO ⁴ K pulvérisé.	74 gr.
Solution de glucose à 1/10	64 c. c.
Eau ajoutée pour rendre fluide	50 c. c.

Mode opératoire. — Au mélange de permanganate, sérum et eau, on ajoute goutte à goutte, en agitant, la solution de glucose. Echauffement considérable.

Volume du filtrat : 250 cent. cubes.

Préparation du cyanate d'argent. — Après neutralisation partielle de la liqueur, au moyen d'acide nitrique dilué à 1/5, addition de nitrate de calcium, filtration, introduction de nitrate d'argent et d'acide nitrique jusqu'à réaction neutre ou à peine acide, onessore et lave le précipité, qu'on traite par l'eau bouillante. La liqueur filtrée se trouble aussitôt en se refroidissant.

Analyse :

Matière	AgCl	Urée	Argent p. 100 de sel		Urée p. 100 gr. de sel d'argent	
			Trouvé	Théorie	Trouvé	Théorie
0,1333	0,1265	»	71,52	72	»	»
0,1508	»	0,123			40	40

GLYCOCOLLE ET AMMONIAQUE.

Proportions des réactifs :

Glycocolle	1 gr.
Eau.	30 c. c.
Ammoniaque	10 c. c.
MnO ⁴ K pulvérisé	7 gr.

Mode opératoire. — On introduit en plusieurs fois le permanganate dans la solution ammoniacale de glycocolle et on agite

avec la tige d'un thermomètre. Dès que la température atteint 50°, on refroidit puis on ajoute de nouvelles doses de persel. On maintient ensuite à 40° jusqu'à décoloration.

Durée totale de l'oxydation : 45 minutes.

Volume de liqueur : 100 cent. cubes.

Préparation du cyanate d'argent : comme dans les expériences précédentes.

Analyse :

Matière : 0,417 AgCl : 0,1105 Trouvé Ag p. 100 : 74,14 Théorie : 72

*
* *

CHAPITRE VI

Influence de la présence d'oxyde de cuivre sur les rendements en acide cyanique et urée, obtenus dans l'oxydation permanganique ammoniacale des principes immédiats.

Phénomène de réduction dans un milieu oxydant.

Les principes naturels peuvent produire d'importantes quantités d'acide cyanique et d'urée. Le rendement dépend, dans certaines limites, du degré d'oxydabilité de la substance dans le milieu considéré, de la puissance du réactif oxydant, de sa concentration, de celle de l'ammoniaque et aussi parfois de la présence de certaines matières minérales, telles que les sels de cuivre, dont l'influence extrêmement nette s'est révélée à nous en oxydant la cellulose en solution cupro-ammoniacale.

1. — *Oxydation ammoniacale de la dextrose, en présence ou non d'oxyde de cuivre.*

Une solution ammoniacale de dextrose, oxydée par le permanganate de calcium, ne contient après oxydation que 0 gr. 57 d'urée p. 100 grammes de dextrose, sans chauffage et 2 gr. 85 p. 100 après chauffage.

Si on reproduit la même expérience en présence de carbonate de cuivre, le rendement en urée, égal à 2 gr. 57 p. 100 de dextrose dans la liqueur non chauffée, s'élève à 21 gr. 85 p. 100 après chauffage.

Proportion des réactifs :

A. Oxydation sans cuivre :

Dextrine	0 gr. 3
Ammoniaque à 22°	10 c. c.
Permanganate de calcium cristallisé . .	6 gr.

B. Oxydation avec cuivre :

Dextrine	0 gr. 5
Ammoniaque	10 c. c.
Permanganate de calcium cristallisé . .	6 gr.
Carbonate de cuivre précipité.	4 gr.

Mode opératoire. — Aux deux solutions de glucose ammoniacal, avec ou sans cuivre, on ajoute par petites portions le permanganate, on essore, on lave le peroxyde et on complète le volume de liqueur à 100 cent. cubes.

Dosage de l'urée. — A 10 cent. cubes de chacune des liqueurs, provenant des expériences A et B, non chauffés, ou chauffés une heure vers 95°, dans le même bain, on ajoute 20 cent. cubes d'acide acétique cristallisé et 4 c. c. 5 de xanthidol méthylique à 1/10.

La xanthyl-urée, lavée à l'ammoniaque (expérience avec cuivre) à l'eau et à l'alcool est recueillie et dosée comme à l'ordinaire.

	$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{array}{c} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{array} \text{O})^2$		Urée, pour 100 gr. de dextrine, formée:		
	pour 10 c. c.				
	av. chauff.	apr. chauff.	av. chauff.	apr. chauff.	pend. chauff.
Expér. A. Sans cuivre	0 gr. 002	"	0 gr. 57	"	"
	"	0 gr. 01	"	2 gr. 85	2 gr. 28
Expér. B. Avec cuivre	0 gr. 009	"	2 gr. 57	"	"
	"	0 gr. 0765	"	21 gr. 85	19 gr. 28

2. — *Oxydation cupro-ammoniacale de l'amidon.*

Mêmes proportions que pour la dextrine, même mode opératoire.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{array}{c} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{array} \text{O})^2$		Urée pour 100 gr. d'amidon	
pour 10 c. c.			
avant chauffage	après chauffage	avant chauffage	après chauffage
0 gr. 007	"	2 gr.	"
"	0 gr. 085	"	24 gr. 28

3. — *Oxydation cupro-ammoniacale de la cellulose.**Proportion des réactifs :*

Coton hydrophile.	0 gr. 5
Ammoniaque à 22°	20 c.c.
Carbonate de cuivre pur précipité	1 gr.
Permanganate de calcium	6 gr.

Mode opératoire. — A la solution cupro-ammoniacale de cellulose, agitée avec un thermomètre, on ajoute le permanganate par portion de 1 gramme d'abord (quatre), puis de 2 grammes (une), de manière que la température ne dépasse pas 40°. Dès la première addition du persel, la liqueur s'épaissit en une masse gluante de couleur vert-brun, puis se liquéfie par agitation.

Durée de l'expérience.	30 minutes.
Volume du filtrat et des eaux de lavage. .	100 c.c.

Pour 10 c.c.		Urée pour 100 gr. de cellulose	
avant chauffage	après chauffage	avant chauffage	après chauffage
0 gr. 003	»	0 gr. 85	»
»	0 gr. 066	»	18 gr. 85

Lorsqu'on verse l'acide acétique dans la liqueur provenant du chauffage, on constate un curieux phénomène; *celle-ci se trouble et dépose un précipité blanc de sel cuivreux, dû à l'action réductrice d'une substance formée pendant l'oxydation de la cellulose.*

4. — *Oxydation cupro-ammoniacale de la caséine.*A. PAR LE PERMANGANATE CALCIQUE. — *Proportion des réactifs :*

Caséine pure du lait de vache. . .	0 gr. 5
Ammoniaque à 22°	10 c.c.
Eau.	10 c.c.
Carbonate de cuivre	1 gr.
Permanganate de calcium	8 gr.

La solution cupro-ammoniacale de caséine, agitée avec un thermomètre, reçoit le persel par portion de 1 gramme (trois), puis de 3 grammes (une) et enfin de 2 grammes (une).

Variation de la température 20 à 60°
 Durée d'introduction du réactif 30 minutes.
 Volume du filtrat et des eaux de lavage . . 100 c.c.

Pour 10 c.c.		Urée pour 100 gr. de caséine	
avant chauffage	après chauffage	avant chauffage	après chauffage
0 gr. 0145	»	4 gr. 1	»
»	0 gr. 07	»	20 gr.

B. PAR LE PERMANGANATE DE POTASSIUM. — *Proportion des réactifs :*

Caséine. 1 gr.
 Ammoniaque à 22° 30 c.c.
 Carbonate de cuivre 1 gr.
 MNO^4K pulvérisé. 15 gr.

Température maximum prise par le mélange. . 57°.
 Durée de l'expérience. 1 heure.
 Volume de liqueur 100 c.c.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{matrix} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{matrix} \text{O})^2$ pour 10 c.c.		Urée pour 100 gr. de caséine		
avant chauffage	après chauffage	avant chauffage	après chauffage	pendant chauffage
0 gr. 025	»	3 gr. 57	»	»
»	0 gr. 1765	»	25 gr. 21	21 gr. 64

La liqueur a été chauffée une heure vers 95°, en présence de chlorure d'ammonium.

. . .

CHAPITRE VII

Aptitude des hydrates de carbone à engendrer l'acide cyanique et l'urée par oxydation permanganique, en milieu ammoniacal concentré.

L'urée prend naissance lorsqu'on oxyde des solutions contenant autant de glucose que le sang (1 gr. 50) et des doses d'ammoniaque comparables ou inférieures à celles de l'organisme (0 gr. 10 à 0 gr. 01 par litre).

La quantité de glucose étant dans ces expériences bien supé-

rière à celle de l'ammoniaque, qu'arrive-t-il lorsqu'on brûle, au contraire, des traces de glucose en milieu fortement ammoniacal ?

Les expériences citées nous ont révélé l'existence probable d'une relation entre la glycogénèse et l'uréogénèse, celles qui suivent conduisent à considérer l'aldéhyde formique et l'acide cyanhydrique comme termes intermédiaires, instables, précurseurs de l'urée, et, par conséquent, à rapprocher la formation de ce corps de la synthèse des principes naturels chez les végétaux.

1. — *L'oxydation de très petites quantités de glucose au sein de l'ammoniaque concentrée, engendre des proportions considérables d'acide cyanique et d'urée.*

Après tautomérisation par la chaleur de cyanate d'ammonium le rendement en urée peut dépasser 70 p. 100 du glucose mis en expérience. Un molécule de glucose est susceptible de donner plus de deux molécules d'urée.

a) OXYDATION DE 0 GR. 025 DE GLUCOSE, OBTENTION DE 65 GR. D'URÉE POUR 100 DE GLUCOSE. — *Proportion des réactifs :*

Solution de glucose à 1/200 dans l'ammoniaque à 22°	5 c. c.
d'où glucose	0 gr. 025
Chlorure d'ammonium	4 gr. 5
Permanganate de potassium pulvérisé	1 gr. 3

Mode opératoire. — Dans plusieurs tubes à essais de 200 millimètres de longueur et de 20 millimètres de diamètre munis de bec, contenant chacun le chlorure d'ammonium dissous dans la solution de glucose, on introduit, en une fois, le persel et on agite avec la tige d'un thermomètre. La réaction, assez vive, se déclare bientôt, elle soulève le mélange et porte la température vers 60°. En quelques instants, le permanganate subit la destruction totale.

Dosage de l'urée dans le mélange non chauffé. — Le produit de la réaction, délayé dans 5 cent. cubes d'eau, est porté sur filtre sans pli; l'intérieur du tube et le précipité manganique sont lavés à l'aide de 22 cent. cubes d'acide acétique. Le filtrat incolore reçoit ensuite 1 c. c. 5 de xanthidrol méthylique.

Xanthyl-urée, recueillie le lendemain, successivement lavée à l'acide acétique à 50 p. 100, à l'eau froide, à l'eau chaude, à l'alcool et séché : 0 gr. 0055, d'où urée p. 100 de glucose :

$$\frac{0,0055 \times 100}{7 \times 0,025} = 3 \text{ gr. } 14.$$

Dosage de l'urée dans le mélange chauffé une heure vers 95°.

— Après avoir taré les tubes, on les plonge dans un bain d'eau, chauffé vers 95°. Un bouillonnement assez vif soulève la masse et la ferait jaillir hors des vases, si leur capacité était plus faible que celle indiquée. Lorsque la mixture ne se boursoufle plus, on lave la paroi intérieure avec 5 cent. cubes d'eau, agite et on abandonne les tubes dans le bain pendant une heure.

Après avoir rétabli avec de l'eau les poids primitifs, on essore, on lave vases et précipités avec 22 cent. cubes d'acide acétique, pour ajouter finalement au filtrat incolore 2 cent. cubes de xanthidrol méthylique.

L'urée est recueillie le lendemain et lavée comme il a été dit ci-dessus.

CO (NH — CH $\begin{matrix} \text{C}^1\text{H}^4 \\ \text{C}^2\text{H}^4 \end{matrix}$ O) ² pour 25 milligr. de glucose			Urée pour 100 grammes de glucose			$\frac{2 \text{ mol. gr. urée}}{1 \text{ mol.-gr. glucose}} \times 100$
av. chauff.	apr. chauff.		av. chauff.	apr. chauff.	pend. chauff.	Théorie
0 gr. 0055	"		3 gr. 14	"	"	"
	0,114			65,1	61,96	66,66
	0,114			65,1	61,96	66,66
	0,115			65,7	62,56	66,66

b) OXYDATION DE 0 GR. 02 DE GLUCOSE, OBTENTION DE 70 GRAMMES D'URÉE POUR 100 DE GLUCOSE. — *Proportion des réactifs :*

Solution de glucose à 1/200 dans l'ammoniaque à 22°.	4 c. c.
d'où glucose.	0 gr. 02
Chlorure d'ammonium	2 gr.
Permanganate de potassium pulvérisé.	1 gr. 50

Mode opératoire. — Comme dans la précédente expérience.

Dosage de l'urée dans le mélange chauffé une heure à 95°. — A la mixture refroidie, on ajoute 5 cent. cubes d'acide acétique, on agite, on filtre, puis on lave finalement vase, précipité et filtre à l'aide d'acide acétique pur, d'abord (10 cent. cubes), puis étendu au 1/3 de son volume d'eau (15 cent. cubes). Le filtrat

incolore, qui occupe un volume de 30 cent. cubes, reçoit 1 c. c. 5 de xanthidrol méthylique.

$\text{CO}(\text{NH}-\text{CH} \begin{smallmatrix} \text{C}^6 \text{H}^4 \\ \text{C}^6 \text{H}^4 \end{smallmatrix} \text{O})^2$	Urée pour 100 grammes	$\frac{2 \text{ mol.-gr. urée}}{1 \text{ mol.-gr. glucose}} \times 100$
pour 0 gr. 02 de glucose	de glucose	Théorie
0 gr. 095	67,8	66,6
0 gr. 095	67,8	66,6
0 gr. 098	70	66,6

c) OXYDATION DE 1 CENTIGRAMME DE GLUCOSE, OBTENTION DE 71 GRAMMES D'URÉE POUR 100 DE GLUCOSE. — *Proportion des réactifs :*

Solution de glucose à 1/1.000 dans l'ammoniaque à 22° 10 c.c.
 Chlorure d'ammonium. 2 gr.
 Permanganate de potassium pulvérisé 1 gr. 5

Mode opératoire. — Comme le précédent.

$\text{CO}(\text{NH}-\text{CH} \begin{smallmatrix} \text{C}^6 \text{H}^4 \\ \text{C}^6 \text{H}^4 \end{smallmatrix} \text{O})^2$	Urée pour 100 grammes	$\frac{2 \text{ mol.-gr. urée}}{1 \text{ mol.-gr. glucose}} \times 100$
pour 0 gr. 01 de glucose	de glucose	
0 gr. 047	67	66,6
0 gr. 048	68	
0 gr. 050	71	
0 gr. 050	71	
0 gr. 0495	70	

2. — *L'oxydation de très petites quantités d'amidon, d'inuline ou de cellulose, en milieu ammoniacal concentré et en présence d'oxyde de cuivre, engendre des quantités considérables d'acide cyanique et d'urée.*

Après tautomérisation du cyanate d'ammonium par la chaleur, le rendement en urée est compris entre 50 et 70 p. 100 de la substance soumise à l'oxydation.

OXYDATION DE LA CELLULOSE EN SOLUTION CUPRO-AMMONIACALE.
 — *Proportion des réactifs :*

Papier à filtrer pour analyse. 0 gr. 15
 Ammoniaque à 22° 150 c.c.
 Carbonate de cuivre précipité 1 gr.
 Permanganate de potassium pulvérisé. 1 gr. 50
 Chlorure d'ammonium 2 gr.

Mode opératoire. — Dans de larges tubes à essais, munis de bec, contenant le permanganate et 10 cent. cubes de liqueur à oxyder, on ajoute en triturant avec une baguette de verre et par petites portions le chlorure d'ammonium. Le tout est placé au bain-marie pendant quelques minutes jusqu'à cessation de bouillonnement de la mixture. Après rinçage des parois des tubes avec 2 cent. cubes d'eau et chauffage au bain-marie une heure vers 92°, on ajoute 10 cent. cubes d'acide acétique et on refroidit dans un mélange de glace et de sel, pour précipiter la majeure partie des chlorures. Essorage et lavage avec 17 cent. cubes d'acide acétique et 2 cent. cubes d'eau.

Le filtrat, traité par 1 c. c. 5 de xanthidrol-méthylque, abandonne la xanthyl-urée que l'on recueille et pèse le lendemain :

CO (NH — CH $\begin{matrix} \nearrow \text{C}^6\text{H}^4 \\ \searrow \text{C}^6\text{H}^4 \end{matrix} \text{O})^2$	Urée pour 100 grammes
pour 0 gr. 01 de cellulose	de cellulose
0 gr. 048	68,57
0 gr. 0485	69,2
0 gr. 0490	70

OXYDATION PERMANGANIQUE DE L'INULINE EN SOLUTION CUPRO-AMMONIACALE. — En opérant comme pour la cellulose, on trouve :

CO (NH — CH $\begin{matrix} \nearrow \text{C}^6\text{H}^4 \\ \searrow \text{C}^6\text{H}^4 \end{matrix} \text{O})^2$	Urée pour 100 grammes
pour 0 gr. 1 d'inuline	d'inuline
0 gr. 038	54,2
0 gr. 038	54,2

CHAPITRE VIII

3. Aptitude de l'aldéhyde formique à engendrer l'acide cyanique et l'urée par oxydation en présence d'ammoniaque.

1. — *Le rendement en urée atteint des valeurs bien plus élevées que dans l'oxydation ammoniacale du glucose, lorsqu'on oxyde le plus simple des hydrates de carbone, l'aldéhyde formique, ou son dérivé ammoniacal, l'urotropine.*

100 parties de CH_2O peuvent produire 140 parties d'urée, après tautomérisation du cyanate d'ammonium.

Dans de larges tubes à essais munis de bec, contenant 10 cent. cubes de solution de polyoxyméthylène à 1/1.000 dans l'ammoniaque concentrée, on introduit 2 grammes de chlorure d'ammonium et 1 gr. 5 de $\text{MnO}\cdot\text{K}$ pulvérisé. On triture à l'aide de la tige d'un thermomètre. Après destruction du permanganate, on chauffe avec précaution au bain-marie à 95° pour chasser une partie de l'ammoniaque et éviter le soulèvement ultérieur de la masse. Quand la matière s'est affaissée, après avoir bouillonné quelques instants, on rince la paroi du vase avec 2 cent. cubes d'eau, puis on abandonne une heure au bain-marie vers $92-95^\circ$.

On mélange ensuite avec 10 cent. cubes d'acide acétique, on refroidit pour faire déposer les chlorures, on essore et on lave avec 17 cent. cubes d'acide acétique et 2 cent. cubes d'eau.

Le filtrat, additionné de 1 c. c. 5 de xanthidrol méthylique, dépose la xanthylurée que l'on recueille le lendemain.

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{smallmatrix} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{smallmatrix} \text{O})^2$ pour 0 gr. 01 de CH^2O	Urée pour 100 grammes de CH^2O
0,096	137,1
0,096	137,1
0,0985	140,7

Dans des conditions expérimentales semblables, l'oxydation de l'hexaméthylènetétramine a donné les résultats suivants :

$\text{CO}(\text{NH} - \text{CH} \begin{smallmatrix} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{smallmatrix} \text{O})^2$ pour 0 gr. 0077 d'urotropine	Urée pour 100 grammes d'urotropine
av. chauff. apr. chauff.	av. chauff. apr. chauff.
0	0
0,066	122
0,067	124
0,065	120
0,064	118
0,065	120

2. — *Le mécanisme de la formation artificielle de l'urée par oxydation et la synthèse des principes naturels chez les végétaux.*

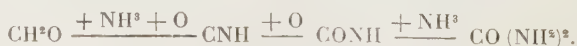
L'extraordinaire aptitude de l'aldéhyde formique à engendrer l'acide cyanique et l'urée, jointe à d'autres observations, nous

suggère l'hypothèse que ce corps doit précéder l'urée dans l'oxydation artificielle des hydrates de carbone en présence de l'ammoniaque.

Sans préjuger ce qui se passe dans l'organisme, il est cependant permis de constater combien cette hypothèse s'écarte de la théorie actuelle de l'uréogénèse qui voit un précurseur de l'urée dans l'acide carbonique, substance incombustible, incapable de participer directement sous cet état à la synthèse des principes naturels. Les expériences qui précèdent nous amènent au contraire à faire dériver l'urée d'un corps combustible, dont l'activité chimique et la puissance synthétique sont incomparables : l'aldéhyde formique, premier terme supposé de l'assimilation chlorophyllienne.

Entre l'aldéhyde formique présumé et l'acide cyanique, découvert et saisi par nous dans les produits d'oxydation des substances organiques, se place nécessairement une autre substance transitoire, fort répandue chez les végétaux : l'acide cyanhydrique. Tandis que la théorie de l'origine carbonique de l'urée est sans lien chimique visible avec le mécanisme de la nutrition, l'hypothèse de son origine formaldéhydique établit, au contraire, une étroite relation entre la genèse de ce corps et celle des principes naturels.

Les deux corps qui, isolément ou ensemble, ont permis de réaliser les synthèses des matières sucrées, des acides aminés, des bases xanthiques et puriques... paraissent être ceux-là mêmes qui précèdent la formation de l'urée dans l'oxydation artificielle des principes naturels :



(Laboratoire de chimie organique,
Faculté des Sciences de Lille.)

RECHERCHES SUR LE *SPIROCHÆTA ICTEROHEMORRAGIÆ* INADA ET IDO

par MARIAN GIESZCZYKIEWICZ

(avec la planche XVII).

(Travail du laboratoire du Dr AUGUSTE PETTIT.)

I

Sur les corpuscules apparaissant dans les cultures de *Spirochæta icterohemorrhagiæ*.

Un grand nombre de Spirochétidés produisent des corpuscules arrondis aussi bien dans les organes des vertébrés et des invertébrés que dans les cultures.

Leishman, Dutton et Todd, Breinl, Carter, Wolbach les ont étudiés en ce qui concerne le Spirochète de la fièvre récurrente d'Afrique ; Balfour, Fantham, Hindle, Marchoux et Couvy les ont observés dans la spirochétose des Poules ; Noguchi les a signalés dans les cultures de presque tous les Spirochètes qu'il a réussi à cultiver (*Spirochæta duttoni*, *kochii*, *obermeieri*, *novyi*, *gallinarum*, *phagedenis*, *Treponema pallidum*, *Tr. mucosum*) ; Balfour, O'Farrell, Meironsky les ont également vus chez le *Treponema pallidum*. J. V. Scott Macfie les retrouve chez le *Spirochæta urethræ* ; Bosanquet en a donné une description pour le *Spirochæta anodontæ* ; Wolbach et Binger les ont constatés dans des cultures de deux Spirochètes isolés de l'eau (*Spirochæta elusa* et *S. biflexa*). Ils ont été étudiés dans les cultures du *Spirochæta icterohemorrhagiæ* par Martin et Pettit, Hübener et Reiter, Reiter et Ramme.

En ce qui concerne leur nature, les opinions des divers auteurs diffèrent diamétralement. Les uns (Marchoux et Couvy, Wolbach) les tiennent tout simplement pour des produits de dégénérescence ou bien dénieient leur origine spirochétosique ;

les autres (Leishman, Balfour, Dutton, Todd) leur attribuent un rôle important dans le cycle évolutif de ces parasites. Certains auteurs (Hindle) distinguent deux sortes de granules que nous examinerons successivement :

a) Les premiers se forment soit à l'extrémité, soit latéralement ; ils surpassent, en général, l'épaisseur du corps et peuvent acquérir un volume considérable ; le plus souvent, on n'en compte qu'un seul par micro-organisme, et, jamais, ils ne sont nombreux. On s'accorde à considérer ces corpuscules comme des formes dégénératives.

b) La seconde catégorie est caractérisée par des formations multiples (10-15), petites (guère plus volumineuses que le corps), finissant par se disséminer ; finalement, le Spirochète n'est plus représenté que par une gaine, contenant parfois 1-2 granules ; l'élimination des formations en question est en rapport avec des mouvements actifs que Balfour a comparés aux secousses d'un Chien sortant de l'eau (dog shaking movement). Ce ne sont que ces granules que certains auteurs (surtout Hindle) envisagent comme un stade évolutif de ces parasites.

Dans ces conditions, MM. Louis Martin et Auguste Pettit avaient jugé nécessaire de reprendre l'étude de cette question ; sur leur conseil, je me suis appliqué à étudier la formation des corpuscules dans les souches de *Sp. icterohemorrhagiæ*, entretenues en cultures à l'Institut Pasteur : celles-ci se pratiquent à l'étuve à 29°, dans le sérum de Lapin dilué à 1/6, recouvert d'huile de vaseline. Les Spirochètes y poussent abondamment dès la fin de la première semaine. A ce moment, de petits granules apparaissent soit à l'extrémité, soit sur le côté du micro-organisme, et se colorent de même façon que les Spirochètes. Dans une culture de sept jours, les corpuscules sont peu nombreux et très petits ; on ne les y distingue pas facilement. Ce n'est qu'au bout de quelques semaines qu'ils deviennent abondants et que, même, ils surpassent en abondance les Spirochètes normaux. Il existe cependant des moyens d'accélérer leur formation : un des plus simples, c'est de soumettre la culture à des températures plus élevées (L. Martin et A. Pettit).

A l'étuve à 36-37°, ils prédominent au bout de deux, trois semaines ; les Spirochètes deviennent de plus en plus rares (fig. 6) ; en dehors de quelques formes à peu près spiralées, on

ne trouve guère que des débris, des tronçons de filaments sur lesquels adhèrent encore des corpuscules. En même temps, l'aspect macroscopique de la culture se modifie : si elle était trouble (opalescente) au début, elle s'éclaircit ultérieurement, les corpuscules et les Spirochètes se collectant au fond du tube ; ils y forment de petits grains blancs visibles à l'œil nu, qu'une agitation assez forte suffit à désagréger. Les cultures plus âgées renferment des amas analogues, qui peuvent comprendre des corpuscules présentant une certaine analogie avec des *Micrococci*.

Pour éliminer la possibilité d'une contamination, les cultures sont systématiquement contrôlées par ensemencements effectués sur gélose, bouillon, bouillon additionné de sérum, bouillon stérilisé par l'ébullition et recouvert d'huile de vaseline, gélose ascite, gélose Veillon. Invariablement, les cultures sont restées négatives. D'ailleurs, un examen microscopique attentif permet de différencier les corpuscules des cocci. Les premiers sont polymorphes et se colorent difficilement ; les seconds sont uniformes et se colorent facilement, en prenant une teinte plus foncée.

Les températures de 36-37°, bien qu'accéléraient la formation de corpuscules, sont cependant incapables de faire disparaître complètement les Spirochètes normaux. Si on les recherche avec suffisamment de soin, on les y retrouve même après quatre-vingt semaines. Cependant, si on soumet une culture bien développée de Spirochètes à la température d'environ 40°, la formation des corpuscules s'y effectue si rapidement qu'au bout de trois jours, on ne retrouve plus de Spirochètes normaux : une culture qui abondait en formes spiralées ne présente plus alors que des corpuscules et des débris de Spirochètes. Si on a recours à des températures encore plus élevées, le temps nécessaire à la production des corpuscules diminue. Un seul chauffage d'une demi-heure à 48° suffit pour faire apparaître des granules dans la majorité des Spirochètes (fig. 7). Néanmoins, les températures basses n'empêchent pas la formation des corpuscules. A la glacière, leur nombre est considérable déjà au bout d'une semaine (fig. 4) ; après un séjour de deux à trois semaines, une culture peut parfois se transformer entièrement en corpuscules. Cette influence des températures basses n'est pas cependant

aussi constante que celle des températures élevées. Une température de 15° environ est la moins favorable à leur formation ; c'est à cette température que les Spirochètes persistent le plus longtemps sous leur forme spiralée. La dégénérescence s'y traduit plutôt par l'apparition de formes plus longues à spires détendues (fig. 5) que par celle de corpuscules (Voir Martin et Pettit, Spirochètose ictérohémorragique, fig. 4).

J'ai essayé aussi d'influencer la formation des corpuscules par certains agents chimiques. Ceux qui entraînent des changements dans la réaction du milieu provoquent la formation de corpuscules. En additionnant une culture d'un sixième de son volume d'une solution décimale d'un acide faible (acide acétique cristallisable) ou de soude, on peut observer, vingt-quatre heures plus tard, l'apparition de nombreux corpuscules se formant en quantité variable sur la majorité des Spirochètes (fig. 9, 12). Une solution hypotonique, obtenue en diluant un volume de la culture dans environ 20 (ou davantage) volumes d'eau distillée, n'exerce pas d'action efficace sur la formation des corpuscules. Les substances telles que le phénol à 1 par 1.000, ou le sublimé à 1 par 50.000, semblent tuer et fixer les Spirochètes trop rapidement pour qu'il puisse se former des corpuscules. Par contre, les solutions hypertoniques (chlorure de sodium à 5 p. 100) favorisent la formation de corpuscules petits, mais assez nombreux (fig. 8).

Les corpuscules sont généralement arrondis, mais leur forme est très variable, parfois ellipsoïdale ou polyédrique (fig. 6). Leur volume n'est pas plus fixe que leur forme. A mesure que les corpuscules grandissent, les Spirochètes qui les ont formés dégèrent. Leurs spires ne se laissent plus distinguer, leur taille diminue : parfois un corpuscule adhérent à un tronçon de Spirochète simule un coccus qui serait muni d'un cil (fig. 3).

Un Spirochète forme d'ordinaire un seul corpuscule (fig. 4, 3), quelquefois deux (fig. 2) et parfois davantage dans des cultures anciennes (fig. 4). Un corpuscule dépasse généralement l'épaisseur d'un Spirochète. La formation de granules nombreux et minuscules dans la totalité du corps du Spirochète ne peut être observée que rarement dans les cultures en question. J'ai réussi cependant à les mettre en évidence même dans les cultures chauffées une seule fois à 48°, mais je n'ai pas pu observer ce

phénomène à l'ultramicroscope; ainsi je suis incapable de dire s'il s'accomplissait du processus décrit par Leishman et Balfour.

Les corpuscules en question ne prennent pas le Gram; ils se colorent difficilement par les couleurs basiques d'aniline (fuchsine, bleu de méthylène, thionine), mieux par le Giemsa. Dans les préparations à l'argent, ils prennent une teinte brune plus ou moins foncée suivant la durée et la température de la nitratisation. Chaque procédé de coloration met en évidence des individus colorés plus ou moins intensément. Les méthodes d'examen de prédilection auxquelles chaque culture était soumise, sont: 1° l'examen à l'ultramicroscope; 2° la coloration par le mélange de Giemsa, après fixation par les vapeurs d'acide osmique; 3° la méthode de Fontana-Tribondeau. Ces trois méthodes se complètent mutuellement.

La signification biologique des corpuscules est une question des plus difficiles à élucider; correspondent-ils à un processus purement dégénératif ou bien ont-ils quelque analogie avec les spores des Bactéries? En d'autres termes, est-ce là une forme sous laquelle le Spirochète peut persister, dans certaines conditions, pour reproduire ensuite, dans d'autres conditions, sa forme typique? Si cette dernière conception était juste, il serait rationnel qu'une culture, contenant des corpuscules, soit plus résistante vis-à-vis des divers agents nocifs. Or, il n'en est rien: une culture plus ancienne et, par conséquent, riche en corpuscules n'est pas plus résistante vis-à-vis des températures élevées qu'une culture jeune; toutes deux sont tuées par les mêmes températures en même temps.

Une culture âgée, d'environ trois semaines, dans laquelle le nombre des corpuscules surpasse de beaucoup celui des Spirochètes est chauffée pendant une demi-heure à 48°; le repiquage pratiqué avant le chauffage est positif; celui effectué après le chauffage reste négatif. Répétée à la température de 45°, l'expérience fournit les mêmes résultats. Plusieurs cultures jeunes de Spirochètes sont tuées également par ces températures.

Au cours de la transformation des Spirochètes en corpuscules, de nombreux repiquages ont été pratiqués afin de rechercher à quel moment disparaît la vitalité d'une culture

en voie de transformation. Les premiers résultats ont été ambigus; ensuite, je parvins à éliminer certaines causes d'erreur, ce qui me permit d'obtenir des renseignements significatifs et constants. Pour cela, il faut : 1° examiner surtout le dépôt se formant au fond du tube, car dans les cultures anciennes, les Spirochètes, en perdant plus ou moins leur mobilité, se ramassent bien souvent au fond, englobés dans les amas de corpuscules signalés ci-dessus; 2° il ne faut pas se borner à un seul procédé d'investigation; il est nécessaire d'en utiliser plusieurs, notamment l'examen à l'ultramicroscope; excellent quand il s'agit de mettre en évidence des Spirochètes jeunes, souples et mobiles, ce dernier moyen se montre parfois insuffisant lorsque les cultures ne renferment que quelques Spirochètes peu nombreux, rigides, immobiles et entourés de très nombreux corpuscules; 3° les Spirochètes sont très sensibles au moindre changement de milieu. Quand on commence à employer une nouvelle série de milieux, on observe parfois que les Spirochètes ne s'y développent qu'avec difficulté ou bien n'y poussent absolument pas.

En prenant toutes les précautions possibles, j'ai pu constater que : 1° une culture, ne contenant plus de Spirochètes normaux mais uniquement des corpuscules, ne se repique pas; 2° une culture perd plus vite sa vitalité dans les conditions favorables à la formation des corpuscules que dans les conditions qui conservent plutôt les formes typiques de Spirochètes et ralentissent la formation des corpuscules.

Voici, à titre d'exemple, une des nombreuses expériences que j'ai effectuées : une souche, récemment isolée de *Sp. icterohemorragiæ*, estensemencée le 27 décembre en trois tubes du même milieu de culture (sérum de Lapin dilué). Les tubes sont placés ensemble à l'étuve à 29°, jusqu'au 2 janvier. C'est alors que les cultures, qui ont très bien poussé jusqu'à ce moment, sont retirées de l'étuve et soumises à l'action de différentes températures. Elles sont alors examinées à intervalles rapprochés au point de vue de la morphologie et de la vitalité. La morphologie est étudiée à l'ultramicroscope, au Giemsa et au Fontana-Tribondeau; les repiquages sont effectués à l'aide d'une pipette Pasteur, soit à la dose de 1/2—1 cent. cube de culture sans toucher au dépôt, soit en prélevant au

fond du tube quelques gouttes seulement, mais contenant quelques grains blancs qui s'y déposent après un certain temps. Lesensemencements opérés de la seconde façon étaient généralement plus efficaces. Voici les détails :

TUBE 1. — Placé le 2/1 à l'étuve à 40°. — 3/1. Spirochètes normaux très nombreux; corpuscules peu nombreux; repiquage positif. — 5/1. Pas de Spirochètes; quelques filaments atypiques, probablement débris de Spirochètes, corpuscules très nombreux, repiquage négatif. — 7/1. Même tableau; repiquage négatif même en ensemençant le dépôt. — 9/1. Mêmes résultats. — 12/1. Mêmes résultats. — 16/1. Mêmes résultats. Le tube est soumis de nouveau à 29° et observé jusqu'au 9/2. Les Spirochètes ne réapparaissent plus. Les repiquages restent négatifs.

TUBE 2. — Placé le 2/1 à la glacière. — 3/1. Spirochètes normaux nombreux; corpuscules peu nombreux; repiquage positif. — 5/1. Spirochètes nombreux; corpuscules aussi nombreux; repiquage positif. — 7/1. Spirochètes nombreux; corpuscules nombreux; repiquage négatif (on ensemente le liquide sans toucher au dépôt). — 9/1. Spirochètes peu nombreux; corpuscules nombreux; repiquage positif (on ensemente le dépôt). — 12/1. Spirochètes peu nombreux, corpuscules nombreux, repiquage négatif (avec le dépôt). — 16/1. Spirochètes très rares; corpuscules nombreux; repiquage négatif. — 22/1. Plus de Spirochètes; corpuscules nombreux; repiquage négatif. — 31/1. Pas de Spirochètes; corpuscules nombreux; le tube est remis à l'étuve à 29° et observé jusqu'au 10/11; les Spirochètes ne réapparaissent pas; les repiquages restent négatifs.

TUBE 3. — Placé le 2/2, dans une armoire du laboratoire, température environ 15°. — 3/1. Spirochètes normaux nombreux; corpuscules très rares; repiquage positif. — 5/1. Mêmes résultats. — 7/1. Spirochètes nombreux; corpuscules très rares, repiquage négatif (on ensemente le liquide sans toucher au dépôt). — 9/1. Spirochètes nombreux, corpuscules rares; repiquage positif (on ensemente le dépôt). — 12/1. Spirochètes nombreux; corpuscules rares; pas de repiquage. — 16/1. Spirochètes nombreux; beaucoup de formes allongées à spires distinctes; corpuscules rares; repiquage positif avec le dépôt. — 22/1. Mêmes résultats. — 31/1. Spirochètes nombreux; corpuscules pas rares; pas de repiquage. — 10/2. Spirochètes nombreux; corpuscules nombreux; repiquage positif avec le dépôt. — 21/2. Spirochètes nombreux; corpuscules nombreux; repiquage négatif avec le dépôt. — 6/3. Spirochètes nombreux; corpuscules nombreux; repiquage positif avec le dépôt. — 13/3. Mêmes résultats.

Or, à la température du laboratoire, qui était défavorable à la formation de corpuscules, la culture est restée vivante plus de deux mois et demi. Faute de temps, la culture ne put être observée jusqu'à dépérissement complet.

Pour répondre à l'objection que le repiquage ne constituerait qu'une méthode trop peu sensible pour attester la vitalité

d'une culture, j'ai entrepris quelques expériences sur les animaux, aussi bien sur les Cobayes pour lesquels la spirochètose est le plus souvent mortelle que sur des Rats qui sont à la fois réfractaires à la maladie et réservoirs de virus.

Deux tubes sont ensemencés avec le *Sp. icterohemorragiæ* et maintenus pendant cinq jours à l'étuve à 29°. Les Spirochètes s'y développent abondamment; un tube est alors mis à l'étuve à 40°; l'autre conservé à la température d'environ 15°; cinq jours plus tard, le premier tube ne contient plus de Spirochètes, mais uniquement des corpuscules; quant au second, c'est le contraire. 1 cent. cube pris au fond du premier tube est injecté à un Cobaye et à un Rat blanc, 1/2 cent. cube du deuxième tube est inoculé à un Cobaye témoin et à un Rat blanc témoin. Le premier Cobaye (1) survit.

Les mêmes expériences furent répétées avec d'autres souches de Spirochètes, puis avec une culture transformée en corpuscules au bout d'un séjour de trois semaines à la glacière. Les résultats ont été identiques: il est impossible d'infecter un animal avec une culture transformée en corpuscules, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un animal réservoir de virus.

Toutes ces expériences aboutissent à la conclusion suivante: les corpuscules, apparaissant dans les cultures de *Sp. icterohemorragiæ*, ne sont rien autre que des produits de dégénérescence. Naturellement, les expériences relatées ci-dessus ne nous permettent pas d'affirmer que les Spirochètes sont incapables d'engendrer, dans d'autres conditions que celles envisagées ci-dessus, des formations plus ou moins analogues, mais d'une signification biologique complètement différente.

(1) Ce Cobaye succombe seize jours plus tard à une congestion pulmonaire « sans présenter de signes de spirochètose ni de parasites dans les organes » tandis que le témoin succombe en sept jours à une spirochètose typique: ses organes sont farcis de Spirochètes. Quant aux Rats, on prélève quelques jours plus tard, 1/2 — 1 cent. cube de sang qu'on injecte à des Cobayes. Il est impossible de transmettre la spirochètose avec le sang de Rat injecté avec une culture transformée entièrement en corpuscules, tandis que le sang du Rat témoin qui a reçu des Spirochètes typiques tue un Cobaye en douze jours avec tous les symptômes de la spirochètose et des parasites dans les organes. Pour obtenir une infection avec du sang de Rat, il est préférable de faire le prélèvement pendant la première semaine après l'injection d'une culture de Spirochètes; quelques semaines plus tard, l'expérience échoue le plus souvent.

BIBLIOGRAPHIE

BALFOUR, Spirochætosis of Sudanese Fowls. *Fourth Report Wellcome tropical Research Laboratories at the Gordon Memorial College Khartoum*, 1911.

— Resistent Form of *Treponema pallidum*. *Journ. of the royal Army med. Corps*, **16**, p. 695.

BOSANQUET, Brief Notes on the Structure and Development of *Spirochæta anodontæ* Keysseltz. *Quarterly Journ. of microscopical Science*, **56**, 1911, p. 387.

BREINL, On the Morphology and life History of *Spirochæta duttoni*. *Annals of tropical Med. and Parasitology*, 1908, p. 435.

CARTER, The presence of *Spirochæta duttoni* in the Ova of *Ornithodoros moubata*. *Annals of tropical med. and Parasitology*, p. 157, 1907.

DUTTON et TODD, Morphology of *Spirochæta duttoni*, *Lancet*, **52**, p. 1523, 1907.

FANTHAM, Spirochætes and their Granule Phase. *British med. Journ.*, 18 mars 1916.

O' FARREL et BALFOUR, Granule Shedding in *Treponema pallidum* and associated Spirochæte. *Journ. of the royal Army med. Corps*, **17**, 1911.

HINDLE, On the Life-Cycle of *Spirochæta gallinarum*. *Parasitology*, **4**, p. 463, 1911.

HÜBENER et REITER, Beiträge zur Ätiologie der Weil'schen Krankheit, 2 Mitteil. *Deutsche med. Woch.*, n° 1, p. 1, 1916.

LEISHMAN, Experiments in Connection with the Transmission of the Tick Fever. *Journ. of the royal Army med. Corps*, **42**, n° 2, 1909.

— Mechanism of Infection in Tick-Fever and hereditary Transmission of *Spirochæta duttoni* in the Tick. *Lancet*, **1**, p. 10, 1910.

— « Granule » Clumps in *Ornithodoros moubata* and their Relation to the *Spirochæta* of African relapsing Fever. *Ces Annales*, **32**, n° 2, p. 49, 1918.

MARCHOUX et COUVY, Argas et Spirochètes. *Ces Annales*, **27**, 1913.

MARTIN et PETTIT, Spirochètose icterohémorragique, Paris, 1919.

MEIROWSKY, Beobachtungen an lebenden Spirochäten. *Münch. med. Woch.*, p. 1870, 1913.

NOBUCHI, A Method for the pure Cultivation of pathogenic *Treponema pallidum*. *Journ. of exper. Med.*, **14**, p. 99, 1911.

— *Treponema mucosum*. *Journ. of exper. Med.*, **16**, p. 194, 1912.

— Pure Cultivation of *Spirochæta duttoni*, *kochii*, *obermeier*, *novyi*. *Journ. of exper. Med.*, **16**, p. 199, 1912.

— Pure Cultivation of *Spirochæta phagedenis*. *Journ. of exper. Med.*, **16**, p. 261, 1912.

— Cultivation of *Spirochæta gallinarum*. *Journ. of exper. Med.*, **16**, p. 620, 1912.

REITER et RAMME, Beiträge zur Ätiologie der Weil'schen Krankheit, IV Mitteil. *Deutsche med. Woch.*, p. 1282, 1916.

J. W. SCOTT MACFIE, Urethral Spirochætosis. *Parasitology*, **9**, p. 274.

TODD, The Granules of *Spirochæta duttoni*. *Bull. de la Soc. de pathol. exotique*, **42**, n° 9, 1919.

WOLBACH, Distribution and Morphology of *Spirochæta duttoni* and *Sp. kochii* in experimentally infected Ticks. *Journ. of med. Research*, **30**, 1914.

WOLBACH et BINGER, Cultivation of a free living filterable *Spirochæta*. *Journ. of med. Research*, **30**, n° 1, p. 9, 1914.

— A Filterable *Spirochæta* from free Water. *Journ. of med. Research*, n° 1, p. 23, 1914.

II

Sur la morphologie de *Spirochæta icterohemorrhagiæ*
en milieux acides.

Au cours des recherches exposées ci-dessus, mon attention a été attirée par les changements morphologiques que présente le *Sp. icterohemorrhagiæ* corrélativement avec les modifications de réaction du milieu.

Si on mélange dans un tube environ 10 cent. cubes d'une culture jeune en sérum dilué avec 1 cent. cube d'une solution décimale de soude, les Spirochètes deviennent rigides, plus épais et formant plusieurs gros corpuscules arrondis. (fig. 9). Ce changement ne s'observe qu'au bout de vingt-quatre — quarante-huit heures. Bien plus intéressants sont les changements de forme qui se produisent si le milieu devient acide. Si on ajoute à 10 cent. cubes d'une culture jeune de Spirochète environ 0,5 cent. cube d'une solution à 1 p. 100 d'acide acétique cristallisable, la forme des Spirochètes se modifie au bout d'un certain temps.

Dans les conditions normales, le corps des Spirochètes de culture présente un certain nombre (une vingtaine) de spires (fig. 11); après acidification du milieu, il se produit un raccourcissement et les spires, qui étaient espacées d'environ 0,5 μ , sont séparées par des intervalles à peu près doubles; elles apparaissent moins nombreuses et plus lâches; en un mot l'aspect se rapproche de celui du Tréponème (fig. 12). Parfois les Spirochètes deviennent plus épais (fig. 10); simultanément on peut observer la formation de corpuscules arrondis (fig. 12). Ces changements sont faciles à apprécier par comparaison avec des témoins (fig. 11), aussi bien à l'ultramicroscope que sur frottis colorés (spécialement par le colorant de Giemsa après fixation par les vapeurs d'acide osmique, ou bien par le procédé de Fontana-Tribondeau). Les repiquages pratiqués à ce moment restent négatifs. Pour provoquer le phénomène en question, il ne suffit pas de transformer la réaction alcaline normale du milieu en réaction acide, il faut pousser l'acidifica-

tion un peu plus loin jusqu'au degré indiqué ci-dessus. Si la quantité d'acide est bien dosée, la culture se trouble légèrement au bout de quelques heures ; si vingt-quatre heures après on neutralise l'acide, le trouble disparaît, mais les Spirochètes ne reviennent pas à la forme normale.

Cette constatation m'a amené à rechercher l'influence de la réaction de l'urine sur la morphologie des Spirochètes. D'une façon générale, cette sécrétion produit une fragmentation et une dissolution de ces micro-organismes. Dans quelques cas, seulement, en mélangeant à parties égales une urine fortement acide et une culture, les Spirochètes se sont modifiés d'une façon comparable à celle qu'on obtient en acidifiant le milieu de culture avec de l'acide acétique ; cependant les changements n'ont jamais été aussi constants ni aussi généralisés, même à égalité de degré acidimétrique. Peut-être peut-on expliquer ces résultats de la façon suivante : les Spirochètes modifiés par l'acide acétique persistent sous leur forme nouvelle pendant des jours entiers. Dans l'urine, cependant, les conditions sont moins favorables ; si l'urine est faiblement acide, le phénomène ne se produit pas ; dans le cas contraire, les micro-organismes se fragmentent et ne tardent guère à se détruire et le phénomène décrit ci-dessus ne se produit que pendant un temps très court : par conséquent, il devient très difficile de l'observer. Cependant, certains auteurs (1) avaient déjà remarqué que l'aspect du *Sp. icterohemorrhagiæ* dans l'urine est plutôt polymorphe et, en tout cas, différent de celui des Spirochètes de cultures. Or les changements de forme sont probablement dus à l'acidité de l'urine, la lyse à l'influence d'autres facteurs agissant dans l'urine.

Je prie M. Auguste Pettit d'agréer mes remerciements pour son bienveillant accueil dans son laboratoire. Je lui exprime ma gratitude pour l'intérêt qu'il a porté à ces recherches et pour les conseils qu'il a bien voulu me donner.

(1) N. FIESSINGER, La spirochèturie. *Journ. méd. français*, n° 4, 1919. — PIERRE-PAUL LÉVY et GUILLÉ, Action de l'urine sur le *Treponema* de la syphilis. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1919, 82, n° 2.

EXPLICATION DE LA PLANCHE XVII

FIG. 1. — Un corpuscule minuscule entre le milieu et l'extrémité droite du Spirochète. Premier stade du développement. On distinguait très bien les spires qui sont petites et nombreuses. Culture de sept jours à l'étuve à 29°.

FIG. 2. — Un corpuscule plus grand, à l'extrémité gauche; un autre plus petit à l'extrémité droite du Spirochète. On ne distingue plus les spires, visibles cependant sur deux autres Spirochètes, à droite. Même culture que la figure 1.

FIG. 3. — Un corpuscule sur une forme courte (probablement le reste d'un Spirochète). Même culture que figures 1 et 2.

FIG. 4. — Un groupe de Spirochètes et de corpuscules après un séjour d'une semaine à la glacière.

FIG. 5. — Forme anormale de corpuscules après séjour d'un mois à la température d'environ 15°. En haut, un Spirochète à spires détendues, comme on les voit souvent dans les cultures anciennes, maintenues à la température d'environ 15°.

FIG. 6. — Corpuscules nombreux, Spirochètes très rares. Les corpuscules présentent une variabilité extrême de volume, de forme et d'intensité de la coloration. Séjour de quatre semaines à l'étuve à 37°.

FIG. 7. — Corpuscules apparus consécutivement à un seul chauffage à 48° pendant une demi-heure. En bas, un type différent de corpuscules (corpuscules nombreux, minuscules et répandus sur tout le corps du Spirochète).

FIG. 8. — Corpuscules apparus consécutivement à l'action d'une solution hypertonique (chlorure de sodium à 5 p. 100 pendant vingt-quatre heures).

FIG. 9. — Corpuscules apparus consécutivement à l'action de 1 cent. cube de soude décinormale, ajouté à 10 cent. cubes d'une culture jeune. Au bout de vingt-quatre heures.

FIG. 10. — Déformation de Spirochètes sous l'action de 1/2 cent. cube d'acide acétique à 0,05 p. 100 ajouté à 10 cent. cubes de culture jeune de Spirochètes.

FIG. 11. — Même culture immédiatement avant l'acidification. Spirochètes normaux.

FIG. 12. — Déformation de Spirochètes consécutivement à l'action d'acide acétique à 0,05 p. 100 (voir fig. 10) au bout d'une heure. Spirochètes à spires relâchées, formant des corpuscules. A droite et en bas, Spirochètes encore normaux.

Le Gérant : G. MASSON.



FIGURE 1.



FIGURE 2.

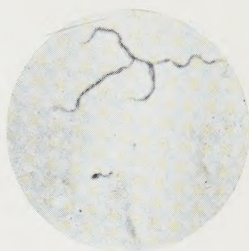


FIGURE 3.

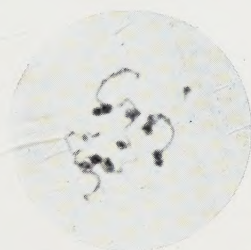


FIGURE 4.

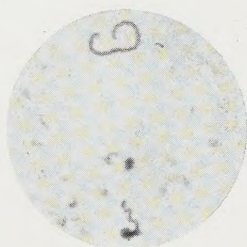


FIGURE 5.

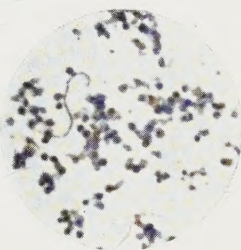


FIGURE 6.



FIGURE 7.

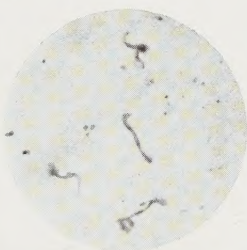


FIGURE 8.

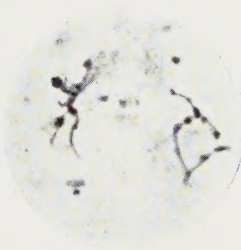


FIGURE 9.



FIGURE 10.



FIGURE 11.



FIGURE 12.

(Photo Jeantet)



